

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

IDENTIFICATION DU MARQUEUR
DE CELLULES SOUCHES CANCÉREUSES
CD133 COMME NOUVELLE CIBLE DE LA MT1-MMP
DANS LES CELLULES TUMORALES DU CERVEAU

MÉMOIRE

PRÉSENTÉ

COMME EXIGENCE PARTIELLE

DE LA MAÎTRISE EN CHIMIE

PAR
NICOLAS FONTAINE

SEPTEMBRE 2010

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL
Service des bibliothèques

Avertissement

La diffusion de ce mémoire se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire *Autorisation de reproduire et de diffuser un travail de recherche de cycles supérieurs* (SDU-522 – Rév.01-2006). Cette autorisation stipule que «conformément à l'article 11 du Règlement no 8 des études de cycles supérieurs, [l'auteur] concède à l'Université du Québec à Montréal une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de [son] travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, [l'auteur] autorise l'Université du Québec à Montréal à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de [son] travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de [la] part [de l'auteur] à [ses] droits moraux ni à [ses] droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, [l'auteur] conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont [il] possède un exemplaire.»

REMERCIEMENTS

J'aimerais tout d'abord remercier mon directeur de recherche, le docteur Richard Béliveau, pour m'avoir donné la chance exceptionnelle d'effectuer ma maîtrise dans son laboratoire, pendant laquelle j'ai pu apprendre les fondements de la recherche scientifique. J'adresse également tous mes remerciements à mon superviseur, le docteur Denis Gingras, dont l'expérience et le savoir-faire ont grandement contribué non seulement à l'avancement de ce projet, mais aussi à la qualité de ma formation. J'offre de sincères remerciements au docteur Dominique Boivin qui a initié ce projet, pour son amitié, ainsi que pour le temps et l'énergie qu'il m'a consacrés. Je tiens de plus à remercier les docteurs Edith Beaulieu et Sylvie Lamy, pour leur aide et leurs conseils. Pour leur amitié et leur complicité, je remercie Nancy Berger-Thibault, étudiante au doctorat, et Jinane Doumit, étudiante à la maîtrise. Je voudrais aussi remercier tous les autres membres du laboratoire pour leurs conseils tout au long de ma maîtrise. Au CRSNG de même qu'à la fondation UQAM, j'adresse mes remerciements pour leur soutien financier. Enfin, je voudrais remercier mes parents qui ont cru en moi et m'ont soutenu tout au long de mes études.

TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES FIGURES	vi
LISTE DES ABRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES	viii
LISTE DES SYMBOLES	xi
RÉSUMÉ	xii

CHAPITRE I

INTRODUCTION	1
1.1 Le cancer	1
1.1.1 La résistance aux traitements	2
1.2 Les cellules souches cancéreuses	3
1.2.1 Les marqueurs de cellules souches cancéreuses	5
1.2.2 CD133 ou prominin	6
1.3 Les métalloprotéases matricielles, implication pathologique et cancer	12
1.3.1 Les métalloprotéases matricielles	13
1.3.2 Les métalloprotéases matricielles membranaires	15
1.3.3 La métalloprotéase matricielle membranaire de type I	16
1.4 Objectifs	23

CHAPITRE II

MATÉRIEL ET MÉTHODE	30
2.1 Matériel	30
2.1.1 Général	30
2.1.2 Les plasmides	31

2.1.3 Les anticorps	31
2.1.4 Protéines recombinantes	32
2.2 Méthodes.....	32
2.2.1 Culture cellulaire et transfection	32
2.2.2 Immunoprécipitations et immunodétections.....	33
2.2.3 Microscopie confocale	36
2.2.4 Séparation des domaines membranaires sur gradient de sucrose discontinue	37
2.2.5 Clivage in vitro à l'aide de protéines recombinantes.....	38
2.2.6 Construction des mutants du N-terminal de CD133 par mutagenèse dirigée	41

CHAPITRE III

RÉSULTATS.....	42
3.1 La MT1-MMP interagit physiquement avec CD133 de manière dépendante de son activité dans des lignées cancéreuses du cerveau.	42
3.2 L'interaction entre la MT1-MMP et CD133 débute dans le réticulum endoplasmique ou l'appareil de Golgi avant la maturation complète des deux protéines.....	44
3.3 La MT1-MMP clive CD133 de manière spécifique au site ³⁰ KAWN↓Y ³⁴	46

CHAPITRE IV

DISCUSSION.....	61
4.1 Implication du clivage du domaine N-terminal de CD133 dans son interaction membranaire	62
4.2 La MT1-MMP comme régulateur de la fonction d'organisation membranaire de CD133	63

CHAPITRE V

CONCLUSION.....	65
-----------------	----

BIBLIOGRAPHIE.....	66
--------------------	----

LISTE DES FIGURES

Figure	Page
1.1 : Les cellules souches cancéreuses et la résistance aux traitements.....	24
1.2 : Topologie membranaire, structure moléculaire et modification post traductionnelle de CD133.	25
1.3 : Domaines variables des métalloprotéases matricielles	26
1.4 : Mécanisme d'activation de la MMP-2 par la MT1-MMP	27
1.5 : Topologie membranaire, structure moléculaire et modification post traductionnelle de la MT1-MMP.	28
1.6 : Régulation cellulaire de la MT1-MMP.....	29
3.1 : La MT1-MMP interagit avec CD133 de façon dépendante de son activité dans la lignée cancéreuse de médulloblastome DAOY.	49
3.2 : La MT1-MMP interagit avec CD133 de façon dépendante de son activité dans la lignée cancéreuse de glioblastome U-251.....	50
3.3 : La MT1-MMP n'interagit pas avec CD133 dans la lignée cancéreuse colorectale Caco-2..	51
3.4 : La proMT1-MMP interagit avec CD133 avant son activation dans l'appareil de Golgi..	52
3.5 : La délétion de la queue cytoplasmique de CD133 diminue l'efficacité de sa maturation et augmente son interaction avec la MT1-MMP..	53
3.6 : La MT1-MMP interagit avec CD133 dans le réticulum endoplasmique.....	54
3.7 : La MT1-MMP clive CD133 cellulaire endogène et exogène.....	55
3.8 : La MT1-MMP clive CD133 cellulaire à son extrémité N-terminale.....	56
3.9 : Le domaine catalytique de la MT1-MMP clive la protéine recombinante du domaine N-terminal de CD133 : CD133 E1.....	57
3.10 : Le domaine catalytique de la MT1-MMP clive la protéine GST-CD133 E1 découvrant une nouvelle extrémité N-terminale : YELPA.....	58

3.11 : La MT1-MMP clive le domaine N-terminal de CD133 au site 30KAWN↓Y34..	
.....	59
3.12 : Les mutations N33C et Y34K n'empêchent pas le clivage de CD133.....	60

LISTE DES ABRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES

ABC	<i>ATP-binding cassette</i>
APS	persulfate d'ammonium
AML	leucémie myéloïde aigue
BCA	acide bicinchonique
BCS	sérum bovin de veau
BSA	albumine sérique bovine
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CSC	cellule souche cancéreuse
EDTA	acide éthylène diamine tétraacétique
EGTA	acide éthylèneglycol-bis-(-aminoéthyléther) tétraacétique
FBS	sérum fœtal bovin
GD	disialoganglioside
GM	monosialoganglioside

GST	glutathione-S-transférase
MDR	<i>multidrug resistance</i>
MMP	<i>matrix metalloproteinase</i>
MRP	<i>multidrug resistance protein</i>
MTCBP-1	<i>MT1-MMP cytoplasmic-binding protein 1</i>
MT-MMP	<i>membrane type matrix metalloproteinase</i>
PBS	tampon biphosphate salin
PVDF	difluorure de polyvinylidène
RECK	<i>reversion inducing cysteine rich protein with Kazal motifs</i>
SDS-PAGE	<i>sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis</i>
TBS	tampon tris salin
TEMED	N,N,N',N'-teraméthylènediamine
TGF- β	<i>transforming growth factor-beta</i>
TIMP	<i>tissue inhibitor of metalloproteinases</i>
TNF- α	<i>tumor necrosis factor alpha</i>

VEGF *vascular endothelial growth factor*

LISTE DES SYMBOLES

%	pourcentage
°C	degré Celsius
α	alpha
β	bêta
A	ampère
h	heure
kDa	kiloDalton
M	molaire
min	minute
mg	milligramme
ml	millilitre
mM	millimolaire
U	unité enzymatique
V	volt
μ g	microgramme
μ l	microlitre
μ M	micromolaire
(p/v)	(poids/volume)
(v/v)	(volume/volume)

RÉSUMÉ

L'implication de la Membrane Type- Matrix Metalloproteinase (MT1-MMP) dans la progression du cancer a été grandement étudiée dans la dernière décennie. Elle possède une vaste variété de substrats, incluant des composants de la matrice extracellulaire, des cytokines et des récepteurs membranaires. Nos résultats identifient le marqueur de cellules souches (CSC) CD133 comme une nouvelle cible de l'activité protéolytique de la MT1-MMP. Des essais d'immunoprécipitation et de clivage *in vitro* effectués à l'aide de protéines recombinantes ont démontré que la MT1-MMP interagit physiquement avec CD133 et clive son domaine N-terminal à la position ³⁰KAWN↓Y³⁴. De plus, cette interaction semble commencer au niveau intracellulaire, dans le réticulum endoplasmique, avant l'activation de la proMT1-MMP et avant la maturation complète de CD133; toutefois, seulement la forme mature de CD133 peut être clivée. Ces résultats représentent la première interaction protéine-protéine connue de CD133, dont la fonction cellulaire demeure inconnue. Des expériences supplémentaires pourraient mener à une meilleure compréhension de cette protéine et de son rôle dans la biologie des CSCs.

Mots-clés : MT1-MMP, CSC, N-terminal, réticulum endoplasmique

CHAPITRE I

INTRODUCTION

1.1 Le cancer

Le cancer est, après les maladies cardiovasculaires, la deuxième cause de mortalité en Amérique du Nord (Kreiger *et al.*, 2003). La société canadienne du cancer prévoit l'apparition d'environ 173 800 nouveaux cas de cancer en 2010, ainsi que 76 200 décès (Kreiger *et al.*, 2003; Jemal *et al.*, 2009). Environ 40 % des Canadiens seront atteints du cancer au cours de leur vie et 25 % des Canadiens mourront d'un cancer (Kreiger *et al.*, 2003; Jemal *et al.*, 2009), principalement dû à de mauvaises habitudes de vie, comme la mauvaise alimentation ou le tabagisme. Selon l'Organisation Mondiale de la Santé, en 2004, le cancer aurait été responsable de 7,4 millions de décès, correspondant à 13% de la mortalité mondiale. Il est estimé que le nombre de décès par cancer devrait continuer d'augmenter pour atteindre 12 millions par année en 2030 (Organisation mondiale de la santé, 2009).

Le cancer est causé par la prolifération anarchique d'une cellule ayant accumulé des mutations lui apportant un avantage de prolifération et de survie (Melnick *et al.*, 1993). Le phénomène du passage d'une cellule saine à une cellule cancéreuse est appelé la transformation (Hanahan et Weinberg, 2000). La cellule cancéreuse est caractérisée par une prolifération incontrôlée, ainsi qu'une capacité d'invasion vers les tissus proches ou distants formant des tumeurs secondaires que l'on appelle des

métastases et qui sont responsables de 90% des décès dus au cancer (Hanahan et Weinberg, 2000). En 2000, D. Hanahan et R. Weinberg, ont proposé que cette transformation nécessite l'acquisition de six propriétés essentielles (Hanahan et Weinberg, 2000). En premier lieu, une indépendance des cellules vis-à-vis des signaux stimulant la prolifération, par exemple en produisant leurs propres facteurs de croissance. Deuxièmement, on retrouve une insensibilité aux signaux inhibant la prolifération. En troisième lieu, l'abolition de l'apoptose ou mort programmée, joue également un rôle critique dans la transformation cancéreuse, en augmentant son taux de survie. Vient ensuite l'acquisition d'un potentiel de réplication illimité. Il y a également la capacité d'envahir d'autres tissus pour former des métastases. Et enfin, la capacité d'induire l'angiogenèse, soit de créer de nouveaux vaisseaux sanguins à partir du réseau déjà existant, ce qui permet d'augmenter l'afflux de nutriments nécessaires à la progression tumorale (Hanahan et Weinberg, 2000).

1.1.1 La résistance au traitement

Bien que les connaissances sur la biologie du cancer s'accroissent d'année en année et que les traitements deviennent de plus en plus efficaces, beaucoup de questions restent sans réponse. Les traitements peuvent avoir des résultats variables selon les cas et s'avèrent parfois être complètement inefficaces. Il arrive parfois que l'on constate une recrudescence de la tumeur chez des patients, un certain temps après la thérapie (figure 1.1). Certains facteurs jouant un rôle dans ces cas de résistance aux traitements sont connus et sont sujets à de nombreuses investigations par les chercheurs.

Par exemple, un des phénotypes de résistance les plus problématiques retrouvé chez les cellules cancéreuses correspond à une surexpression de la glycoprotéine P,

aussi appelée la MDR1 et encodée par le gène ABCB1 (Ueda *et al.*, 1987). Elle fait partie de la famille B des transporteurs de type ATP-binding cassette et possède la capacité d'exclure de nombreuses molécules de chimiothérapie hors de la cellule telles que l'étoposide, la doxorubicine, la vincristine et la vinblastine (Ambudkar *et al.*, 1999). Il existe de nombreuses autres protéines capables de transporter les médicaments hors de la cellule, comme les Multidrug Resistance Protein (MRP) qui font partie de la famille C des transporteurs de type ATP-binding cassette (Ambudkar *et al.*, 2003).

Outre l'expression de protéines spécifiques de résistance, une sous-population de cellules appelée « cellules souches cancéreuses » (CSC) serait capable d'échapper aux traitements et de régénérer la tumeur, mettant ainsi en échec les thérapies actuelles (Wicha *et al.*, 2006); une thérapie visant ces cellules pourrait mener à la guérison de telles tumeurs (Schatton *et al.*, 2009) (figure 1.1).

1.2 Les cellules souches cancéreuses

Au cours des dernières années, de nombreux chercheurs ont délaissé la théorie stochastique du cancer pour s'orienter vers le modèle des cellules souches cancéreuses (Wicha *et al.*, 2006). La théorie stochastique décrit un modèle anarchique où toutes les cellules provenant d'une tumeur possèdent la même capacité d'initier la formation d'une tumeur de type secondaire semblable à la tumeur primaire d'où elle provient, pour former des métastases ou pour régénérer la tumeur après avoir résisté aux traitements anticancéreux. La théorie des CSCs s'oriente vers un modèle plus organisé et hiérarchisé où seule une fraction de la population cellulaire est capable d'initier une tumeur mais à une fréquence très élevée (Reya *et al.*, 2001). Si on en

croit ce modèle, il devrait être possible d'identifier ces cellules dans une tumeur de par leurs différences phénotypiques (Reya *et al.*, 2001).

Cette théorie n'a été sérieusement explorée que dans les dernières décennies; elle prend toutefois son origine en 1855, lorsqu'il fut suggéré par Rudolph Virchow que le cancer pourrait avoir son origine de cellules ayant un phénotype semblable à des cellules embryonnaires (Virchow, 1855). La technologie n'était toutefois pas assez avancée à l'époque pour tenter de le prouver. En 1994, un groupe de chercheurs a découvert une sous-population de cellules provenant de leucémies myéloïdes aiguës (AML) ayant un phénotype de surface $CD34^+CD38^-$ et possédant des caractéristiques de cellules souches, notamment une capacité accrue de propagation dans des souris immunodéprimées par rapport aux cellules $CD34^+CD38^+$ ou $CD34^-$ (Lapidot *et al.*, 1994). Cette découverte fut la première preuve probante appuyant la théorie des CSCs. Il fut démontré plus tard que les AMLs ne pouvaient être initiées et propagées que par des cellules dites souches leucémiques (Bonnet et Dick, 1997; Hope *et al.*, 2004). La capacité d'une population cellulaire à reformer la tumeur d'origine dans des souris immunodéprimées est devenue un critère indispensable pour identifier les CSCs (Tang *et al.*, 2007).

Les cellules souches normales sont capables de se diviser de manière symétrique mais également de manière asymétrique. Elles donnent ainsi naissance à des cellules filles possédant les caractéristiques typiques des cellules souches, avec un potentiel d'auto-renouvellement illimité, ainsi qu'à d'autres cellules qui pourront se différencier en divers types cellulaires (Scadden, 2006). Les CSCs possèdent des capacités similaires aux cellules souches normales; elles sont donc capables de s'auto-renouveler indéfiniment et de se différencier en une diversité de type cellulaire menant à la masse hétérogène de la tumeur; c'est pourquoi elles peuvent régénérer la tumeur d'origine lorsqu'injectées dans des animaux immunodéprimés (Jordan *et al.*,

2006). Elles possèdent une certaine quiescence, leur permettant d'échapper au traitement visant les cellules se divisant rapidement, comme la radiothérapie et la chimiothérapie (Bao *et al.*, 2006). Elles seraient également capables de résister à la chimiothérapie de par une très forte expression de protéines de type ATP-binding cassette (ABC) qui rejettent les drogues hors de la cellule (Guo *et al.*, 2003).

Les capacités de résistance aux traitements et leur pouvoir de régénérer la tumeur d'origine font de ces cellules des suspects idéaux vis-à-vis de la résistance aux traitements. C'est pourquoi elles sont devenues une cible importante dans la lutte contre le cancer.

1.2.1 Les marqueurs de cellules souches cancéreuses

Plusieurs protéines exprimées spécifiquement à la surface des CSCs ont été identifiées au cours des dernières années et utilisées pour visualiser et purifier ces cellules.

CD34 fut le premier marqueur identifiant des CSCs dans des cellules de leucémie myéloïde aigue (Lapidot *et al.*, 1994; Bonnet et Dick, 1997; Hope *et al.*, 2004). On l'a également rapporté dans les CSCs provenant d'adénocarcinome du poumon (Kim *et al.*, 2005).

CD44, le principal récepteur de l'hyaluronane (Aruffo *et al.*, 1990), est présent dans les CSCs des tumeurs de la tête et du cou (Prince *et al.*, 2007), du sein (Al-Hajj *et al.*, 2003), de la prostate (Collins *et al.*, 2005; Patrawala *et al.*, 2006), du pancréas (Li *et al.*, 2007), du colon (Dalerba *et al.*, 2007) et dans les sarcomes osseux (Gibbs *et al.*, 2005).

La capacité de rejeter le HOECHST 33342 due à la surexpression de transporteurs de la famille des ATP-binding cassette, responsable de nombreuses résistances à la chimiothérapie, est également considérée comme un marqueur de CSCs; les cellules entrant dans cette catégorie sont appelées Side population (SP) (Goodell *et al.*, 1996; Guo *et al.*, 2003). ABCB1, ABCC1 et ABCG2 sont les trois membres de cette famille ayant été le plus souvent associés avec les cellules souches normales ou les CSCs (Doyle *et al.*, 1998; Kim *et al.*, 2002; Scharenberg *et al.*, 2002; Dean *et al.*, 2005; Dean, 2006; Ding *et al.*, 2010).

CD133 est exprimé dans les CSCs provenant d'un grand nombre de tissus, tels que le pancréas (Li *et al.*, 2007), la prostate (Richardson *et al.*, 2004), le côlon (O'Brien *et al.*, 2007), le foie (Suetsugu *et al.*, 2006; Yin *et al.*, 2007), les ovaires (Ferrandina *et al.*, 2008; Baba *et al.*, 2009), les reins (Bruno *et al.*, 2006), les poumons (Eramo *et al.*, 2008), la peau (Klein *et al.*, 2007; Monzani *et al.*, 2007; Rappa *et al.*, 2008) et le cerveau (Singh *et al.*, 2004). CD133 est notamment très fortement exprimé dans les CSCs de médulloblastomes (Calabrese *et al.*, 2007) et de glioblastomes (Liu *et al.*, 2006; Salmaggi *et al.*, 2006).

1.2.2 CD133 ou prominin

CD133 est une glycoprotéine transmembranaire d'environ 115-120 kDa ciblée par l'anticorps AC133, un anticorps dont la liaison dépend spécifiquement du statut de glycosylation du CD133 présent à la surface de cellules progénitrices CD34⁺ (Miraglia *et al.*, 1997). Un deuxième anticorps fut produit par le même groupe, visant un épitope différent, également dépendant du statut de glycosylation, qui fut nommé AC141 (Yin *et al.*, 1997). Les deux anticorps permirent la purification de CD133 puis son séquençage (Miraglia *et al.*, 1997). Simultanément, un autre groupe de chercheurs

découvrait l'homologue murin de CD133, également à l'aide d'un nouvel anticorps (MoAB 13A4). Ils nommèrent cette protéine prominin, d'après un mot d'origine latine signifiant proéminent, du fait de sa localisation spécifique dans les protrusions de la membrane plasmique (Weigmann *et al.*, 1997). Aujourd'hui, les deux appellations CD133 et prominin-1 sont utilisées fréquemment mais le terme prominin sert davantage à désigner la famille de protéines dont elle fait partie.

La fonction de CD133 demeure malheureusement encore inconnue à ce jour; on ne lui connaît aucune activité enzymatique, ni de ligand extracellulaire ou de partenaire protéique. Cependant, sa localisation dans les protrusions de la membrane plasmique ainsi que sa capacité d'interagir avec le cholestérol membranaire laisse présumer un rôle dans l'organisation de la membrane (Corbeil *et al.*, 2001). Outre son interaction avec le cholestérol membranaire, CD133 est capable d'interagir via son domaine N-terminal et sa première grande boucle extracellulaire avec d'autres constituants de la membrane: les gangliosides GM1 et GD3 (Taieb *et al.*, 2009). Ces gangliosides sont présents à des niveaux variables d'un domaine membranaire à un autre et pourraient jouer un rôle dans la courbure membranaire des radeaux lipidiques (*lipid raft*) (Sonnino *et al.*, 2007). Il est à noter que la délétion du domaine N-terminal de la protéine murine n'atteint pas la membrane plasmique (Corbeil *et al.*, 1999); il est donc possible que ces domaines de liaisons aux gangliosides puissent réguler la localisation membranaire de CD133 ou encore être impliqués au niveau de l'organisation de la membrane plasmique. Il est possible qu'en maintenant les protrusions membranaires, CD133 soit impliqué dans la polarité et la migration cellulaire via des interactions cellule-cellule ou cellule-matrice (Giebel *et al.*, 2004). De plus, CD133 se colocalise avec la protéine d'adhésion CD44 lors de la polarisation des cellules progénitrices CD133⁺CD44⁺ (Giebel *et al.*, 2004).

D'autres indices semblent indiquer la possibilité que CD133 posséderait un rôle d'organisateur membranaire. CD133 est présent dans les cellules photoréceptrices

rétiniennes et un changement de cadre de lecture du gène de CD133 provoqué par la délétion d'un nucléotide au codon 614 induit un dérèglement de la formation des disques photorécepteurs (Maw *et al.*, 2000). Une autre mutation, R373C, a été observée dans des patients atteints de dégénérescence maculaire héréditaire (Yang *et al.*, 2008); son expression dans des souris transgéniques provoque une surcroissance des segments extérieurs des disques membranaires ainsi que leur désorientation (Yang *et al.*, 2008).

1.2.2.1 Structure moléculaire de CD133 et modifications post-traductionnelles

CD133 est codé par le gène PROML1, situé chez l'humain sur le chromosome 4 et chez la souris sur le chromosome 5 et s'étendant sur environ 150 kb avec une structure intron/exon très similaire d'une espèce à une autre (Maw *et al.*, 2000; Fargeas *et al.*, 2003; Shmelkov *et al.*, 2004). La structure primaire de CD133 est composée de 865 acides aminés; elle comporte un peptide signal (M¹-S¹⁹), trois domaines extracellulaires dont son extrémité N-terminale (G²⁰-G¹⁰⁸) ainsi que deux grandes boucles comportant huit sites potentiels de N-glycosylation (A¹⁷⁹-Y⁴³³; G⁵⁰⁸-N⁷⁹²), trois petits domaines intracellulaires dont son extrémité C-terminale (F¹³⁰-C¹⁵⁷; G⁴⁵⁵-G⁴⁸⁶; K⁸¹⁴-H⁸⁶⁵), séparés par cinq domaines transmembranaires (I¹⁰⁹-F¹²⁹; F¹⁵⁸-V¹⁷⁸; W⁴³⁴-L⁴⁵⁴; V⁴⁸⁷-F⁵⁰⁷; L⁷⁹³-V⁸¹³) (Miraglia *et al.*, 1997; Yin *et al.*, 1997) (figure 1.2). La composition en acides aminés à elle seule ne contribue qu'à environ 94 kDa sur les 116 kDa de la protéine mature, le reste est dû à une très imposante N-glycosylation (Miraglia *et al.*, 1997; Yin *et al.*, 1997). Cette structure est très proche de celle rencontrée chez son homologue murin, malgré une homologie de séquence de seulement 60% (Weigmann *et al.*, 1997; Corbeil *et al.*, 1998; Miraglia *et al.*, 1998). Chez la souris, CD133 est d'abord exprimée sous une forme immature de 105 kDa, puis est maturée en sa forme de 116 kDa (Corbeil *et al.*, 1999). Les sucres de la forme immature de 105 kDa sont sensibles à la digestion à l'endo H, suggérant qu'elle

correspond à une forme riche en mannose localisée dans le réticulum endoplasmique ou à un compartiment précoce de l'appareil de Golgi, où elle est convertie en la forme mature de 116 kDa, insensible à l'endo H mais sensible à la PNGase F (Corbeil *et al.*, 1999).

La structure de CD133 peut cependant différer par épissage alternatif selon le tissu et le stade de développement, elle peut comporter jusqu'à 29 exons selon l'espèce considérée (Fargeas *et al.*, 2004). Douze variants (s1 à s12) ont été répertoriés chez la souris et l'humain, impliquant les exons 3, 9, 19, 25, 26a, 26b, 27 et 28 (Miraglia *et al.*, 1997; Miraglia *et al.*, 1998; Corbeil *et al.*, 2001; Yu *et al.*, 2002; Fargeas *et al.*, 2003). L'exon 3 code pour une partie du domaine N-terminal notamment présent dans le variant s2 mais absent dans le variant s1, tandis que les exons 9 et 19 codent respectivement pour des segments des premières et secondes boucles extracellulaires (Fargeas *et al.*, 2007). La structure de son extrémité C-terminale est très complexe, l'épissage des exons, 25, 26a, 26b, 27 et 28 permet la construction de six extrémités différentes, pouvant se terminer par trois différentes séquences consensus de liaison au domaines PDZ qui sont souvent présentes dans des protéines d'échafaudage reliant les protéines membranaires au cytosquelette et qui permettent de maintenir l'organisation de certains complexes de signalisation (Ranganathan et Ross, 1997). Ces séquences sont : PSQH pour les variants s1, s2, s7, s8, s10, s11 et s12, HFTL pour les variants s3, s4 et s5 et SVQC pour le variant s9, le variant s6 ne se termine pas par une telle séquence (Fargeas *et al.*, 2007; Corbeil *et al.*, 2009).

Très peu d'informations sont disponibles sur le rôle de la glycosylation de CD133. L'expression de divers mutants ponctuels des sites potentiels de N-glycosylation ont confirmé la glycosylation des résidus 395, 414 et 548 (Kemper *et al.*, 2010). Une étude récente a démontré que les groupements glycosides de CD133

peuvent subir une $\alpha 2,3$ sialylation terminale, stabilisant ainsi la protéine (Zhou *et al.*, 2010). En effet, en son absence, CD133 serait envoyé aux lysosomes pour être dégradé; ce phénomène se produit dans les CSCs ainsi que dans les cellules souches neurales (Zhou *et al.*, 2010). La délétion de l'extrémité C-terminale du CD133 murin diminue l'expression de la forme mature de 116 kDa au profit de la forme immature de 105 kDa, sans toutefois l'empêcher complètement (Corbeil *et al.*, 1999).

Une recherche approfondie de toutes les phosphoprotéines cellulaires a révélé que les thréonines 266 et 276 ainsi que la sérine 275 de CD133 pouvaient être phosphorylées (Olsen *et al.*, 2006) (figure 1.2). Notre laboratoire a démontré que les kinases Src et Fyn sont capables de phosphoryler les tyrosines 828 et 852 de la queue cytoplasmique (Boivin *et al.*, 2009) présente dans les variant s1 et s2 de CD133 (Fargeas *et al.*, 2007). La tyrosine 828 est contenue dans un motif YDDV qui une fois phosphorylé correspond à un site de fixation aux domaines SH2 de protéines de signalisation comme Src, Fyn ou Nck (Boivin *et al.*, 2009). Malheureusement, de telles interactions protéiques n'ont pas encore été confirmées, laissant une grande incertitude sur la fonction de ces modifications.

1.2.2.2 Polémique sur l'utilisation de CD133 comme marqueur de cellules souches cancéreuses

Bien que de très nombreux groupes ont isolé avec succès des cellules souches cancéreuses à l'aide des anticorps AC133 et AC141 (Richardson *et al.*, 2004; Singh *et al.*, 2004; Bruno *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2006; Suetsugu *et al.*, 2006; Calabrese *et al.*, 2007; Klein *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2007; Monzani *et al.*, 2007; O'Brien *et al.*, 2007; Yin *et al.*, 2007; Eramo *et al.*, 2008; Ferrandina *et al.*, 2008; Rappa *et al.*, 2008; Baba *et al.*, 2009), d'autres équipes ont démontré que certaines populations CD133⁺

possédaient des caractéristiques de cellules souches, y compris la capacité de repeupler la tumeur (Dittfeld *et al.*, 2009; Navarro-Alvarez *et al.*, 2010). Ces données contradictoires ont initié une polémique mettant en péril l'utilisation de CD133 comme marqueur de CSCs. De plus, certains rapports mentionnent des divergences entre l'immunoréactivité aux anticorps AC133 et AC141 de certaines cellules par rapport au contenu en protéine et en ARNm de CD133 (Corbeil *et al.*, 2000; Florek *et al.*, 2005), ajoutant à la complexité du sujet.

Le manque d'information vis-à-vis des épitopes visés par les anticorps AC133 et AC141 avait déjà été soulevé comme une source potentielle d'erreurs dans la détection de CD133. En effet, ces anticorps se lient à des épitopes non définis dépendant du statut de glycosylation, menant au risque de ne pas détecter les formes possédant un statut de glycosylation différent (Bidlemaier *et al.*, 2008). Il a aussi été suggéré que ce serait le statut de glycosylation de CD133 et non la protéine elle-même qui pourrait agir comme un marqueur indirect de CSCs. Ces doutes ont récemment été confirmés. En effet, la différenciation de CSCs provenant des lignées cancéreuses colorectales HT29 et Caco-2 entraîne la diminution de la réactivité à l'AC133, sans altérer les niveaux d'ARNm et de protéines de CD133 (Sgambato *et al.*, 2010). La même observation a été effectuée sur des CSCs colorectales provenant de patients : la réactivité aux anticorps AC133 et AC141 diminue drastiquement lors de la différenciation accompagnée d'un changement du statut de glycosylation, tout en maintenant l'expression membranaire de la protéine dans les cellules différenciées (Kemper *et al.*, 2010). Les résultats de ce groupe démontrent également que les anticorps AC133 et AC141 ne se lient pas aux sucres, mais directement à la protéine, suggérant que la différenciation induit un changement du statut de glycosylation de CD133 qui modifie la structure tertiaire de la protéine et génère le masquage des épitopes reconnus par ces anticorps (Kemper *et al.*, 2010).

À la lumière de ces résultats, il semble raisonnable d'accepter que ce soit le statut de glycosylation de CD133 et non pas la protéine elle-même qui soit un marqueur de CSCs. Il est donc très important de prendre ces faits en considération lors de la purification et de l'étude des CSCs, car l'utilisation de certains outils peut porter à confusion lors de l'analyse des résultats. Par exemple, la détection de l'ARNm de CD133 ou l'utilisation d'anticorps dirigés contre des épitopes non dépendant du statut de glycosylation, ne reflètent que la quantité cellulaire de la protéine et ne donnent donc pas la même information que l'utilisation des anticorps AC133 et AC141. Il est toujours possible d'utiliser CD133 dans l'étude des CSCs; il est cependant nécessaire de procéder avec la plus grande prudence, tant que le sujet n'aura pas été clarifié.

1.3 Les métalloprotéases matricielles, implication pathologique et cancer

La découverte de la première métalloprotéase de la matrice (MMP) remonte à 1962 lors d'une étude sur la remodelisation du collagène lors de la transformation du têtard en grenouille (Gross et Lapiere, 1962). On connaît aujourd'hui l'existence de 24 MMPs différentes qui sont considérées comme des acteurs de premier plan dans la dégradation des protéines de la matrice extracellulaire (Murphy et Nagase, 2008). Elles sont impliquées dans divers mécanismes normaux comme le développement, la reproduction et la maintenance des tissus, ainsi que dans diverses pathologies incluant la destruction tissulaire, les maladies fibrotiques et l'affaiblissement de la matrice extracellulaire (Parks et Mecham, 1998).

Les MMPs, de par leur capacité de remodelage de la matrice extracellulaire, sont également impliquées dans le cancer au niveau de l'invasion tumorale, des métastases et de l'angiogenèse (Chang et Werb, 2001; Visse et Nagase, 2003; Page-McCaw *et al.*, 2007). Les MMPs facilitent l'invasion tissulaire et les métastases par cellules cancéreuses qui les sécrètent, notamment par leur capacité de dégradation des

protéines matricielles comme le collagène, la laminine, la fibronectine et la vitronectine, ouvrant ainsi la voie aux cellules en migration (Chang et Werb, 2001), ou encore par la libération de facteurs de croissance ou de cytokines séquestrées dans la matrice extracellulaire. Le TGF- β par exemple peut être activé et libéré par l'action protéolytique de la MMP-2 ou de la MMP-9 (Yu et Stamenkovic, 2000). Les MMPs peuvent également promouvoir l'angiogenèse en libérant des facteurs proangiogéniques tels que le VEGF-A sous l'action de la MMP-9 (Bergers *et al.*, 2000).

1.3.1 Les métalloprotéases matricielles

Les membres de la famille des MMPs, aussi appelée famille des matrixines (Nagase *et al.*, 1992) sont des endopeptidases appartenant à la superfamille des metzincines; leur activité dépend de la présence de zinc et de calcium et présente une activité maximale à pH neutre (Bode *et al.*, 1994; Parks et Mecham, 1998). Elles possèdent des inhibiteurs spécifiques naturels : les TIMPs (*tissue inhibitor of metalloproteinases*) (Docherty et Murphy, 1990; Nagase *et al.*, 2006). Elles sont produites sous forme de zymogènes inactifs, pouvant être activés par le clivage de leur prodomaine (Parks et Mecham, 1998; Nagase *et al.*, 2006).

Les MMPs sont subdivisées en fonction d'une classification basée, d'une part, sur leur substrat préférentiel de la matrice et, d'autre part, sur leur localisation cellulaire. On distingue les collagénases interstitielles 1-4 (MMP-1, MMP8, MMP-13 et MMP-18) qui dégradent le collagène en triple hélice, les gélatinases A et B (MMP-2 et MMP-9) aussi appelées collagénases de type IV, les stromélysines 1-3 (MMP-3, MMP-10 et MMP-11) incapables de dégrader le collagène, mais possédant une variété d'autres substrats matriciels (dont le nom provient de « stromal cell-derived

metalloproteinase » (Chin *et al.*, 1985)), les matrilysines (MMP-7 et MMP-26) et les métalloprotéases de type membranaire (ancrées à la membrane par un domaine transmembranaire : MMP-14 (MT1-MMP), MMP-15 (MT2-MMP), MMP-16 (MT3-MMP) et MMP-24 (MT5-MMP) (Parks et Mecham, 1998; Itoh *et al.*, 1999; Kojima *et al.*, 2000; Nagase *et al.*, 2006; Strongin, 2009) ou ancrées par un domaine glycosyl-phosphatidylinositol : MMP-17 (MT4-MMP) et MMP-25 (MT6-MMP)) (Parks et Mecham, 1998; Itoh *et al.*, 1999; Kojima *et al.*, 2000; Nagase *et al.*, 2006; Strongin, 2009).

Les membres de la famille des MMPs comportent tous un certain niveau d'homologie de structure et de séquence; elles possèdent toutes un domaine catalytique central autour duquel d'autres domaines caractéristiques ont été ajoutés (Parks et Mecham, 1998; Nagase *et al.*, 2006). Le domaine catalytique possède un site consensus de liaison au zinc HEXXHXXGXXH qui est indispensable à l'activité catalytique (Parks et Mecham, 1998; Nagase *et al.*, 2006). A l'extrémité N-terminale des MMPs se retrouve un peptide signal d'une vingtaine d'acides aminés, suivi du prodomaine qui contient un motif très conservé, PRCGXPD, appelé la « *cysteine-switch* »; la cystéine de cette séquence est capable de lier l'atome de zinc présent au cœur du site catalytique, le gardant ainsi inactif (Parks et Mecham, 1998; Nagase *et al.*, 2006). Certaines MMPs possèdent un domaine d'insertion à la furine RXKR/RRKR à la fin du prodomaine, le clivage intracellulaire de cette séquence par la furine permet la libération du prodomaine et donc l'activation de la protéase (Parks et Mecham, 1998; Nagase *et al.*, 2006; Remacle *et al.*, 2006). Les MMPs ne possédant pas le domaine d'insertion à la furine sont clivées dans le prodomaine par d'autres protéases, exposant le site catalytique qui pourra terminer le clivage du prodomaine de manière autocatalytique (Parks et Mecham, 1998). Vient ensuite le domaine catalytique qui est présent dans toutes les MMPs (Parks et Mecham, 1998; Nagase *et al.*, 2006). Dans le domaine catalytique des gélatinases A et B, se trouve un

domaine contenant trois répétitions semblables à la fibronectine de type II qui permet leur interaction avec leur substrat : la gélatine (Parks et Mecham, 1998; Nagase *et al.*, 2006). Vient ensuite la région charnière présente dans presque toutes les MMPs, ce domaine faisant le lien entre le domaine catalytique et le domaine hémapexine (Parks et Mecham, 1998; Nagase *et al.*, 2006). Le domaine hémapexine a une longueur de 200 acides aminés et constitue l'extrémité C-terminale de la plupart des MMPs; il possède quatre répétitions semblables à l'hémapexine et à la vitronectine qui se replient et sont reliées par des ponts disulfures (Parks et Mecham, 1998; Nagase *et al.*, 2006). Le domaine hémapexine, absent chez la MMP-23 et les matrilysines 1 et 2, n'est pas indispensable à l'activité catalytique; il joue cependant un rôle important au niveau de la spécificité des substrats (Murphy et Knauper, 1997; Parks et Mecham, 1998; Nagase *et al.*, 2006). La MMP-23 ne possède pas de domaine hémapexine; ce dernier est remplacé par un domaine riche en cystéine et un domaine de type immunoglobuline (Nagase *et al.*, 2006). Chez les MMPs de type membranaire ou MT-MMPs, le domaine hémapexine est suivi d'une seconde région charnière le reliant à un domaine d'ancrage à la membrane plasmique (Nagase *et al.*, 2006). Les MT1-MMP, MT2-MMP, MT3-MMP et MT5-MMP sont reliées à la membrane par un domaine transmembranaire d'une vingtaine d'acides aminés suivi d'un dernier domaine également de 20 acides aminés situé dans le cytoplasme (Parks et Mecham, 1998; Nagase *et al.*, 2006); MT4-MMP et MT6-MMP sont, quant à elles, reliées à la membrane par une ancre glycosyl-phosphatidylinositol (Parks et Mecham, 1998; Itoh *et al.*, 1999; Kojima *et al.*, 2000; Nagase *et al.*, 2006) (Figure 1.3).

1.3.2 Les métalloprotéases matricielles membranaires

Les MT-MMPs comportent six membres numérotés de MT1-MMP à MT6-MMP, correspondant respectivement à MMP-14, MMP-15, MMP-16, MMP-17, MMP-24 et MMP-25 (Nagase *et al.*, 2006). Ces enzymes sont divisées en deux familles évoquées

précédemment, soit les MT-MMPs transmembranaires et celles possédant une ancre glycosyl-phosphatidylinositol (Parks et Mecham, 1998; Itoh *et al.*, 1999; Kojima *et al.*, 2000; Nagase *et al.*, 2006). À l'exception du type de domaine d'ancrage à la membrane, les MT-MMPs possèdent toutes le même profil topologique soit, à partir du N-terminal, le peptide signal, le prodomaine avec la « *cystein-switch* », le domaine d'insertion à la furine, le domaine catalytique, une région charnière, le domaine hémopexine, une seconde région charnière, pour se terminer sur le domaine d'ancrage à la membrane (Nagase *et al.*, 2006).

Elles sont activées de façon intracellulaire via le clivage au niveau du domaine d'insertion à la furine et la forme active est ensuite acheminée à la membrane plasmique (Parks et Mecham, 1998; Nagase *et al.*, 2006). La localisation membranaire de ces MMPs joue un rôle clé dans leur exposition à leurs substrats extracellulaires ou membranaires. Outre leurs substrats de la matrice extracellulaire, elles sont capables d'activer d'autres MMPs; par exemple, toutes les MT-MMPs sont capables d'activer la proMMP-2 à la surface cellulaire sauf la MT4-MMP (English *et al.*, 2000).

1.3.3 La métalloprotéase matricielle membranaire de type I

La MT1-MMP est l'une des MMPs ayant été les plus étudiées au cours des dernières décennies. La découverte de cette enzyme remonte à 1994, lorsqu'elle fut identifiée comme récepteur membranaire et activateur de la proMMP2 (Sato *et al.*, 1994). La MT1-MMP est capable d'induire la migration d'une très grande variété de lignées cellulaires (Belien *et al.*, 1999; Koshikawa *et al.*, 2000; Lehti *et al.*, 2000; Gingras *et al.*, 2001; Kajita *et al.*, 2001; Rozanov *et al.*, 2001; Koike *et al.*, 2002; Seiki *et al.*, 2003; Iida *et al.*, 2004; Langlois *et al.*, 2004; Bair *et al.*, 2005) ainsi

qu'une capacité accrue d'invasion de la matrice extracellulaire environnante (Sabeh *et al.*, 2004; Hotary *et al.*, 2006). La MT1-MMP possède un très large éventail de substrats, dont le clivage induit divers effets au niveau de la cellule ou de son environnement, incluant des composants de la matrice extracellulaire, des récepteurs membranaires, des ligands protéiques (Sato *et al.*, 2005) et le prodomaine d'autres MMPs comme la MMP-2 et la MMP-13 (Sato *et al.*, 1994; Knauper *et al.*, 1996).

L'activité de la MT1-MMP est régulée en grande partie par un contrôle très précis de sa localisation cellulaire (Gingras et Beliveau, 2010). Du point de vue catalytique, elle peut également être régulée par les inhibiteurs endogènes des MMPs TIMP-2, TIMP-3 et TIMP-4 mais pas par TIMP-1 (Will *et al.*, 1996; Bigg *et al.*, 2001) ainsi que par la protéine RECK (*reversion-inducing-cystéine rich protein with Kazal motifs*) (Kajita *et al.*, 2001) et par les protéoglycans Testican 1 et 3 (Nakada *et al.*, 2001) (figure 3.6). L'extrémité N-terminale de TIMP-2 se lie au domaine catalytique de la MT1-MMP, formant le complexe MT1-MMP/TIMP-2 qui ne possède aucune activité protéolytique. Ce complexe agit comme un récepteur membranaire pour la proMMP-2 grâce à l'extrémité C-terminale de TIMP-2 qui est capable de lier le domaine hémapexine de MMP-2 (Strongin *et al.*, 1995). Le complexe MT1-MMP/TIMP-2/proMMP-2 enfin formé, une autre molécule de la MT1-MMP peut s'oligomériser à la première déjà présente dans le complexe via leurs domaines hémapexines respectifs, pour finalement cliver le prodomaine de la MMP-2 (Hofmann *et al.*, 2000; Itoh *et al.*, 2001; Lehti *et al.*, 2002) (figure 1.4).

L'importance de sa fonction biologique est révélée par les conséquences de son absence dans des souris modifiées génétiquement. En effet, les souris déficientes pour le gène de la MT1-MMP présentent une dysmorphisme craniofacial, de l'arthrite, de l'ostéopénie, du nanisme, de la fibrose au niveau des tissus mous et meurent prématurément (Holmbeck *et al.*, 1999; Zhou *et al.*, 2000). Elle a également été

retrouvée dans un large éventail de tumeurs du poumon, du côlon, du foie, du sein, du cerveau, de la tête et de la nuque, des ovaires et du col utérin (Okada *et al.*, 1995; Nakada *et al.*, 1999; Zhai *et al.*, 2005).

1.3.3.1 Structure moléculaire de la MT1-MMP et modifications post traductionnelles

La structure moléculaire de la MT1-MMP est semblable aux autres MT-MMPs transmembranaires décrites précédemment (Parks et Mecham, 1998; Nagase *et al.*, 2006), avec le peptide signal (M¹-T²⁰), un prodomaine (M²¹-R¹¹¹) contenant la « cystéine-switch » et le domaine d'insertion à la furine, un domaine catalytique (Y¹¹²-G²⁸⁵), un domaine charnière (E²⁸⁶-I³¹⁸), un domaine hémopexine (C³¹⁹-C⁵⁰⁸) contenant quatre répétitions semblables à l'hémopexine, un second domaine charnière (P⁵⁰⁹-S⁵³⁸), un domaine transmembranaire (A⁵³⁹-F⁵⁶²) et un domaine cytoplasmique (R⁵⁶³-V⁵⁸²) (Sato *et al.*, 1994; Brinckerhoff et Matrisian, 2002; Mori *et al.*, 2002) (figure 1.5).

La MT1-MMP peut subir de nombreuses modifications post traductionnelles, une des plus importantes est le clivage de son prodomaine par la furine ou par les proprotéines convertases, menant à son activation dans l'appareil de Golgi (Mazzone *et al.*, 2004; Remacle *et al.*, 2006).

La première région charnière peut subir une O-glycosylation au niveau des thréonines 291, 299, 300 et de la sérine 301 (Wu *et al.*, 2004) (figure 1.5). De façon intéressante, cette modification nécessite la séquence LL⁵⁷² de la portion cytoplasmique de la MT1-MMP (Ludwig *et al.*, 2008). La formation du complexe

MT1-MMP/TIMP-2/MMP-2 est dépendante de cette modification. En effet, les mutants de la MT1-MMP, défectueux pour cette O-glycosylation, sont incapables de recruter TIMP-2 à la membrane, suggérant que la O-glycosylation de la MT1-MMP pourrait jouer un rôle dans la reconnaissance de ses substrats (Wu *et al.*, 2004).

Le domaine cytoplasmique de la MT1-MMP est sujet à de nombreuses modifications post traductionnelles. La palmitoylation de la cystéine 574 jouerait un rôle essentiel dans la migration cellulaire médiée par la MT1-MMP (Anilkumar *et al.*, 2005) (figure 3.5). La thréonine 567 peut être phosphorylée par la PKC et ainsi augmenter les capacités invasive et proliférative des cellules cancéreuses dans une matrice de collagène en trois dimensions (Deschamps *et al.*, 2008; Moss *et al.*, 2009). Le laboratoire du Dr. Béliveau a également contribué à la caractérisation de ce domaine de la MT1-MMP. Il a également été démontré que la tyrosine 573 peut être phosphorylée, par un mécanisme dépendant de la kinase Src; cette phosphorylation semble jouer un rôle primordial dans la migration des cellules endothéliales et des cellules cancéreuses (Nyalendo *et al.*, 2007). La phosphorylation de la tyrosine 573 est essentielle à la propagation et à la croissance des cellules cancéreuses dans une matrice en trois dimensions *in vitro* ainsi qu'*in vivo* dans un modèle de souris (Nyalendo *et al.*, 2008; Nyalendo *et al.*, 2010) et a été associée à la progression tumorale de cellules de neuroblastomes (Nyalendo *et al.*, 2009).

1.3.3.2 Localisation membranaire et endocytose de la MT1-MMP

La localisation membranaire de la MT1-MMP est primordiale pour médier ses effets sur la migration et l'invasion des cellules tumorales. En effet, la sécrétion d'une forme soluble de la MT1-MMP à laquelle manque son domaine transmembranaire provoque une perte de la capacité à soutenir l'invasion des matrices de collagène et

de fibrine que l'on associe normalement à l'expression de la protéine de type sauvage (Hiraoka *et al.*, 1998; Hotary *et al.*, 2000; Gingras *et al.*, 2001).

Lors de la migration cellulaire, la MT1-MMP se localise dans les lamellipodes et les invadopodes grâce à l'interaction de son domaine hémapexine avec CD44, la situant au front de migration (Nakahara *et al.*, 1997; Sato *et al.*, 1997; Itoh *et al.*, 2001; Galvez *et al.*, 2002; Mori *et al.*, 2002; Nakamura *et al.*, 2004; Itoh et Seiki, 2006; Ouyang *et al.*, 2008) (figure 1.6). Cette localisation contrôlée permet une meilleure efficacité de dégradation de la matrice extracellulaire. La localisation de la MT1-MMP dans ces domaines semble être finement régulée par endocytose (Jiang *et al.*, 2001; Uekita *et al.*, 2001; Remacle *et al.*, 2003) et exocytose (Bravo-Cordero *et al.*, 2007; Steffen *et al.*, 2008). Les différents événements d'endocytose subis par la MT1-MMP dépendent fortement de la séquence de son domaine cytoplasmique.

Par exemple, la MT1-MMP peut interagir via son motif LLY⁵⁷³ du domaine cytoplasmique avec la sous unité $\mu 2$ de la protéine AP-2 qui la recrute ensuite dans des vésicules à clathrine pour y être internalisée par endocytose (Jiang *et al.*, 2001; Uekita *et al.*, 2001; Remacle *et al.*, 2003). La MT1-MMP peut également être internalisée via les cavéoles, un autre type de vésicule membranaire ou de radeaux lipidiques (Annabi *et al.*, 2001; Puyraimond *et al.*, 2001; Remacle *et al.*, 2003; Labrecque *et al.*, 2004). L'internalisation cavéolaire de la MT1-MMP est dépendante de la présence de la queue cytoplasmique, sans laquelle la MT1-MMP s'accumule dans les cavéoles sans être internalisée (Rozanov *et al.*, 2004). Elle dépend également de son interaction spécifique avec la caveolin-1 phosphorylée sur sa tyrosine 14 (Labrecque *et al.*, 2004; Sverdlov *et al.*, 2007).

La MT1-MMP peut être recyclée après son internalisation. Elle est d'abord envoyée dans le réseau trans-Golgi pour être ensuite réacheminée à la membrane

(Wang *et al.*, 2004). Cette séquence nécessite la séquence DKV⁵⁸² du domaine cytoplasmique de la MT1-MMP (Wang *et al.*, 2004) qui correspond à une séquence consensus de liaison au domaine PDZ de eNOS (neuronal nitric oxyde synthase) (Stricker *et al.*, 1997). Le domaine hémopexine de la MT1-MMP peut également interagir avec le domaine N-terminal de CD63, une protéine lysosomale et cette interaction dirige la MT1-MMP vers les lysosomes pour être dégradée (Takino *et al.*, 2003) (figure 3.6).

1.3.3.3 La MT1-MMP et ses substrats

Lorsqu'une cellule entre en migration, la matrice extracellulaire se trouvant sur son chemin doit être dégradée pour lui ouvrir le passage (Murphy et Gavrilovic, 1999). La localisation contrôlée de la MT1-MMP au front de migration, combinée à son activité catalytique spécifique, lui donne un rôle important au niveau de la dégradation de la matrice et de la migration subséquente. La MT1-MMP possède la capacité de dégrader de nombreuses protéines matricielles, dont le collagène de type I, II et III, la gélatine, la laminine 1 et 5, la fibronectine, la vitronectine, l'aggrécane, la fibrine et le lumican (d'Ortho *et al.*, 1997; Ohuchi *et al.*, 1997; Hiraoka *et al.*, 1998; Koshikawa *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2004). La MT1-MMP peut également activer la MMP-2 (Sato *et al.*, 1994) et la MMP-13 (Knauper *et al.*, 1996) qui possèdent leurs propres substrats.

La MT1-MMP peut également cliver des récepteurs membranaires. L'exemple le plus caractérisé de cette catégorie de substrats est le récepteur de l'hyaluronane CD44 (Aruffo *et al.*, 1990), dont le clivage stimule la migration cellulaire (Kajita *et al.*, 2001) et qui est également un marqueur de certaines CSCs (Al-Hajj *et al.*, 2003; Collins *et al.*, 2005; Gibbs *et al.*, 2005; Patrawala *et al.*, 2006; Dalerba *et al.*, 2007; Li

et al., 2007; Prince *et al.*, 2007). Elle peut également cliver d'autres récepteurs membranaires notamment les intégrines αV (Ratnikov *et al.*, 2002), la transglutaminase (Belkin *et al.*, 2001) et la syndecan-1 (Endo *et al.*, 2003), la dégradation de ces récepteurs étant également associée à la migration cellulaire.

Certaines cytokines peuvent être activées par la MT1-MMP, comme la proTNF α , une cytokine inflammatoire qui peut être activée par la MT1-MMP (Tam *et al.*, 2004), ou l'IL-8 qui est connue pour stimuler la migration des leucocytes (Ashcroft *et al.*, 2000; Olson et Ley, 2002) et dont le clivage mène à une forme plus active que la protéine originale (Tam *et al.*, 2004). D'autres cytokines peuvent au contraire être inactivées, comme la protéine mestatine, issue du gène KISS-1, qui normalement diminue la capacité migratoire des cellules cancéreuses et donc la formation de métastases (Ohtaki *et al.*, 2001), mais qui perd toute activité sous clivage de la MT1-MMP (Takino *et al.*, 2003).

Malgré l'identification de nombreux substrats et sites de clivages protéiques de la MT1-MMP, il reste encore très difficile de prédire ces sites dans les substrats suspectés de cette enzyme. En effet, les séquences de clivage retrouvées expérimentalement sont très variables et ne suivent aucun consensus précis. Certains groupes se sont cependant penchés sur la question en utilisant une bibliothèque de peptides contenus dans des bactériophages. Ces résultats ont dévoilé que les séquences PL(G/P) \downarrow L (Ohkubo *et al.*, 1999), PXX \downarrow (Hy) et RXXX \downarrow (Hy)(Po) (Kridel *et al.*, 2002) (où X peut être n'importe quel acide aminé, Hy est hydrophobe et Po est polaire) étaient des séquences de clivage de choix pour la MT1-MMP. La séquence PLG \downarrow L a même récemment été utilisée dans la fabrication d'une protéine recombinante fluorescente, qui après clivage peut s'insérer dans la membrane et ainsi marquer les cellules exprimant la MT1-MMP (Zhao *et al.*, 2010).

1.4 Objectifs

Même si l'implication de la MT1-MMP dans l'initiation et la progression du cancer est bien documentée, de nombreuses caractéristiques et fonctions de cette enzyme demeurent encore à découvrir. Certains rôles lui ont récemment été attribués au niveau de la signalisation, de la migration, de l'invasion et de la différenciation des CSCs (Ries *et al.*, 2007; Annabi *et al.*, 2008; Annabi *et al.*, 2009; Annabi *et al.*, 2009; Lu *et al.*, 2010; Shirvaikar *et al.*, 2010), en plus de son interaction déjà bien connue avec le marqueur de CSCs CD44 (Kajita *et al.*, 2001). Lors de la migration cellulaire, CD133 se concentre au front de migration tout comme CD44 (Giebel *et al.*, 2004), suggérant un rôle possiblement similaire de l'enzyme au niveau de la migration.

Des données issues du laboratoire du Dr. Béliveau démontrent que la MT1-MMP et CD133 possèdent la capacité d'interagir physiquement dans un même complexe protéique et que cette interaction est modulée par l'activité catalytique de la MT1-MMP. **Le but principal** de cette étude est d'éclaircir les paramètres de l'interaction entre la MT1-MMP et CD133. Cette interaction étant influencée par l'activité protéolytique de la MT1-MMP, notre **premier objectif** a été de vérifier si CD133 était un substrat encore non caractérisé de la MT1-MMP, et le cas échéant, de construire un mutant du site de clivage qui y serait résistant. Notre **deuxième objectif** a été de déterminer la localisation cellulaire de cette interaction, pour en comprendre le mécanisme, et finalement, de déterminer les conséquences cellulaires issues de cette interaction.

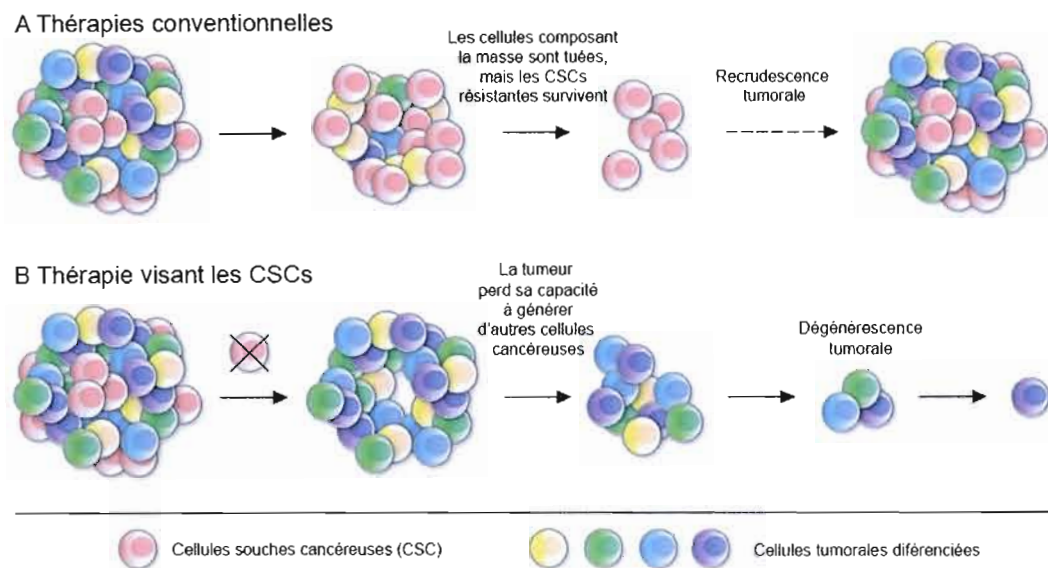


Figure 1.1 : Les cellules souches cancéreuses et la résistance aux traitements

(A) Les cellules souches cancéreuses sont capables de résister aux traitements conventionnels et de reformer la tumeur d'origine. (B) De nouvelles thérapies visant spécifiquement ces cellules pourraient permettre la dégénérescence complète de la tumeur. Figure adaptée de Schatton *et al.*, 2009.

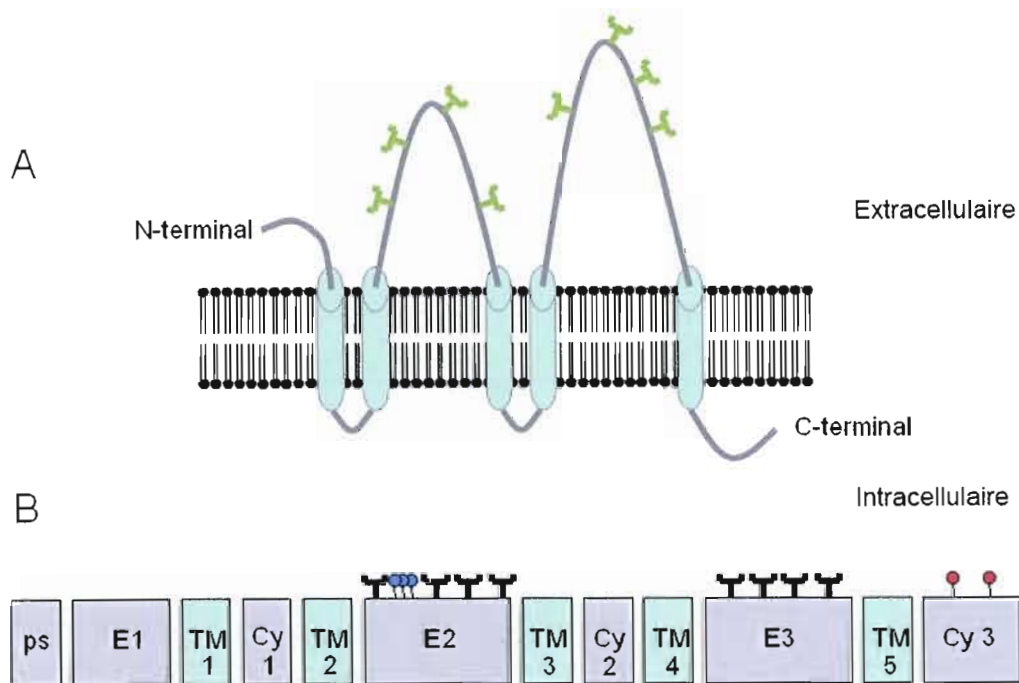


Figure 1.2 : Topologie membranaire, structure moléculaire et modification post traductionnelle de CD133.

(A) CD133 a été grandement utilisée pour purifier les CSCs de très nombreux tissus. Elle se localise préférentiellement dans les protusions de la membrane plasmique et est soupçonnée de jouer un rôle dans l'organisation des radeaux lipidiques via son interaction avec des constituants de la membrane plasmique tel que le cholestérol. Sa localisation au front de migration cellulaire suggère qu'elle pourrait jouer un rôle dans la migration. Sa fonction n'a cependant pas encore été établie avec certitude. Elle possède 5 domaines transmembranaires permettant son ancrage à la membrane plasmique. Son extrémité N-terminale est extracellulaire et son extrémité C-terminale est intracellulaire. (B) Sa structure débute à son N-terminal avec un peptide signal (ps), elle possède cinq domaines transmembranaires (TM1-5), trois domaines extracellulaires (E1-3) et trois domaines cytoplasmiques (Cy1-3). Ses domaines E2 et E3 possèdent chacun 4 sites potentiels de glycosylation (Y), le domaine E2 possède 3 sites de phosphorylation sur sérine/thréonine (P) et le domaine C-terminal Cy3 possède 2 sites de phosphorylation sur tyrosine (T).

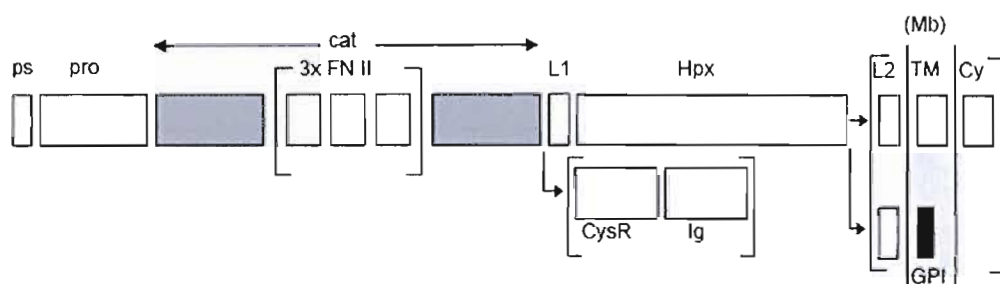


Figure 1.3 : Domaines variables des métalloprotéases matricielles

Les MMPs sont formées par ajout de plusieurs combinaisons de domaines qui varient de l'une à l'autre. A partir de l'extrémité N-terminale, ces domaines sont : le peptide signal (ps), le prodomaine (pro), le domaine catalytique (cat), les domaines semblables à la fibronectine de type II (FN II), le domaine riche en cystéine (CysR), le domaine de type immunoglobuline (Ig), la région charnière ou de liaison (L1), le domaine hémopexine (Hpx), une autre région charnière (L2), le domaine d'ancrage à la membrane par liaison au glycosylphosphatidylinositol (GPI), le domaine transmembranaire (TM) et le domaine cytoplasmique (Cy). Figure adaptée de Nagase *et al.*, 2006.

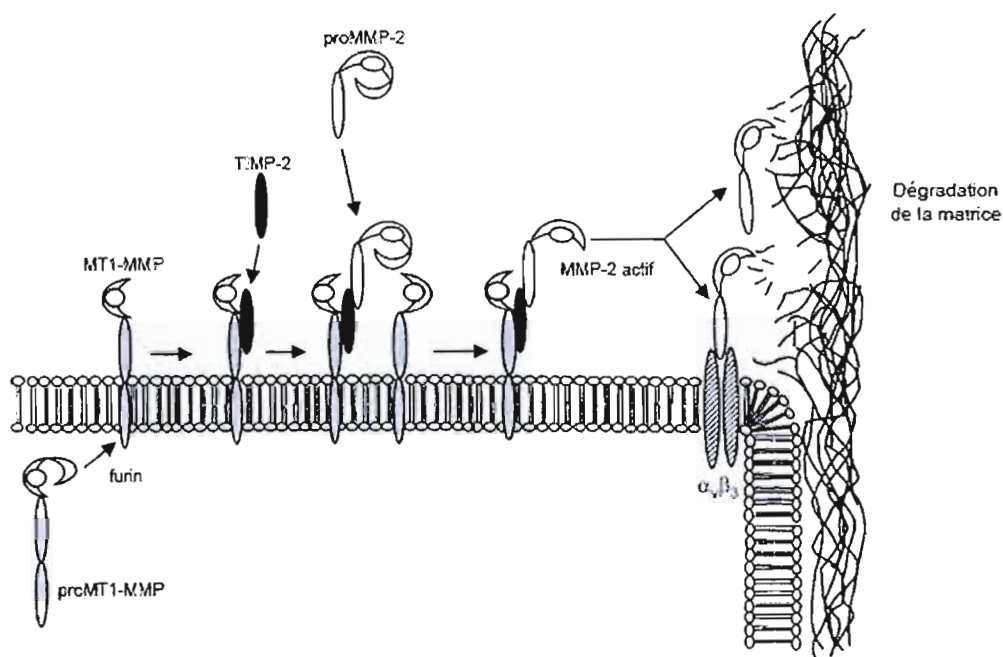


Figure 1.4 : Mécanisme d'activation de la MMP-2 par la MT1-MMP

Après son activation par la furine, la MT1-MMP est acheminée à la membrane plasmique. Son domaine catalytique peut ensuite se lier à son inhibiteur TIMP-2, lui-même capable de lier le domaine hémapexine de la MMP-2 et agissant ainsi comme un récepteur membranaire. La formation du complexe MT1-MMP/TIMP-2/proMMP-2 n'est cependant pas suffisante à l'activation de la MMP-2 du fait de l'inhibition du domaine catalytique de la MT1-MMP par TIMP-2. La proMMP-2 étant ainsi fixée à la membrane, une autre molécule de la MT1-MMP peut venir s'oligomériser à la première par son domaine hémapexine, puis cliver le prodomaine de la MMP-2 qui peut ensuite dégrader ses substrats de la matrice extracellulaire. Figure adaptée de Hofmann *et al.*, 2000.

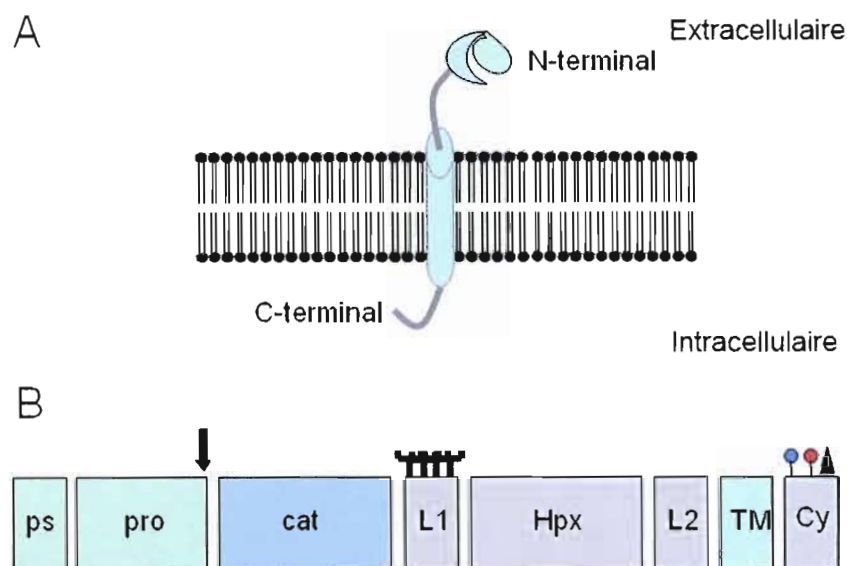


Figure 1.5 : Topologie membranaire, structure moléculaire et modification post traductionnelle de la MT1-MMP.

(A) La MT1-MMP est une protéase impliquée au niveau de la migration et de la prolifération des cellules cancéreuses. Elle accomplit la plupart de ses fonctions par le clivage de nombreuses autres protéines, incluant des constituants de la matrice extracellulaire, des cytokines et des récepteurs membranaires. Elle est fixée à la membrane par un domaine transmembranaire, son extrémité N-terminale est extracellulaire et son extrémité C-terminale est intracellulaire. (B) Sa structure débute à son N-terminal avec un peptide signal (ps), suivie d'un prodomaine (pro), avec ensuite son domaine catalytique (cat), un domaine charnière ou de liaison (L1), un domaine hémopexine (Hpx), une seconde région charnière ou de liaison (L2), un domaine transmembranaire la fixant à la membrane (TM) et un domaine cytoplasmique (Cy). L'activation de la MT1-MMP nécessite le clivage du prodomaine par la furine (↓). Sa région charnière (L1) peut être glycosylée (Y). La spécificité envers ses substrats est principalement médiée par le domaine hémopexine (Hpx). Son domaine cytoplasmique (Cy) peut être phosphorylé sur thréonine (T) et sur tyrosine (Y), il peut aussi être palmitoylé (▲).

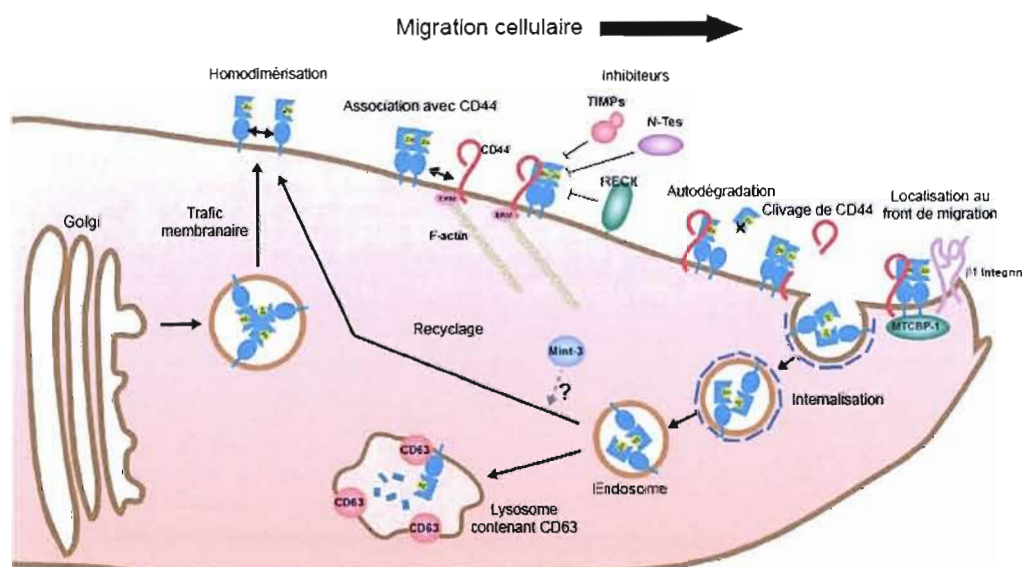


Figure 1.6 : Régulation cellulaire de la MT1-MMP.

La régulation de la MT1-MMP (en bleu) est principalement effectuée au niveau cellulaire par un contrôle très précis de sa localisation et par l'influence de ses inhibiteurs endogènes : les TIMP-2 à 4, la RECK, les Testican 1 et 3 et la MTCBP-1. La MT1-MMP est conduite à la membrane par le transport cellulaire des domaines membranaires, où elle peut s'homooligomériser. Son interaction avec CD44 permet sa localisation au front de migration cellulaire. Elle peut aussi être retirée de la surface cellulaire par internalisation dans des domaines spécialisés où elle peut interagir avec CD63 pour être dégradée dans les lysosomes ou être renvoyée à la membrane plasmique pour être recyclée. Figure adaptée de Itoh et Seiki, 2006.

CHAPITRE II

MATÉRIEL ET MÉTHODE

2.1 Matériel

2.1.1 Général

Les milieux de culture cellulaire Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM), Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) Low et High glucose ainsi que la trypsine ont été obtenus de Wisent (St-Bruno, QC, Canada). Le sérum bovin de veau (BCS) et le sérum bovin foetal (FBS) ont été achetés de Hyclone Laboratories (Logan, UT). La transferrine, le pyruvate, l'orthovanadate, le fluorure de sodium, le sucrose, le triton et le benzimide (Hoechst) proviennent de Sigma-Aldrich (Oakville, ON, Canada). L'albumine sérique bovine (BSA) utilisée pour les dosages de protéines, ainsi que le kit de dosage de protéines μ BCA ont été achetés de Pierce (Rockford, IL) et le spectrophotomètre provient de Molecular Devices (Sunnyvale, CA). Les solutions et le matériel d'électrophorèse, incluant les membranes de PVDF sequi-blot, ont été achetés de Bio-Rad (Mississauga, ON, Canada), à l'exception des membranes de transfert pour la détection et le réactif de chimioluminescence (ECL) qui proviennent de PerkinElmer Life Sciences (Boston, MA). Tous les oligonucléotides utilisés ont été synthétisés par Biocorp ADN Inc (Dollard-des-Ormeaux, QC, Canada).

2.1.2 Les plasmides

Le plasmide original pCR3.1-Uni-AC133 contenant l'ADN de CD133 est un don généreux du Dr. Denis Corbeil (Dresden, Allemagne). Le plasmide codant pour CD133-Flag, contenant un peptide Flag (DYKDDDDK) en son extrémité N-terminale et celui codant pour CD133 CΔ52 ayant été délesté de sa queue cytoplasmique a été produit dans notre laboratoire par le Dr. Dominique Boivin (Boivin *et al.*, 2009). Les plasmides codants pour l'ADN de la MT1-MMP WT et E240A ont été également été produits dans notre laboratoire (Gingras *et al.*, 2001). Le plasmide pGEX4T-3 provient d'Amersham Pharmacia Biotech Inc (Piscataway, NJ).

2.1.3 Les anticorps

L'anticorps dirigé contre la deuxième boucle extracellulaire de CD133 (C24B9) a été obtenu de Cell Signaling Technology (Danvers, MA) et celui contre son C-terminal (ab 19898) de Abcam (Cambridge, MA). L'anticorps reconnaissant le domaine catalytique de la MT1-MMP (Clone LEM-2/15.8) a été obtenu de Millipore (Billerica, MA). L'anticorps anti-Flag (Clone M2) ainsi que l'anticorps anti-actine ont été obtenus de Sigma-Aldrich (Oakville, ON, Canada). L'anticorps anti-6-His a été obtenu de Santa Cruz Biothechnology, Inc (Santa Cruz, CA). Les anticorps anti-souris et anti-lapin provenaient de Jackson ImmunoResearch Laboratories (West Grove, PA). L'anticorps anti-lapin conjugué à la tétraméthylrhodamine (rouge) et l'anticorps anti-souris conjugué à l'Alexa 488 (vert) utilisés pour la microscopie confocale ont été achetés de Molecular Probes d'Invitrogen (Burlington, ON).

2.1.4 Protéines recombinantes

La PNGase F a été obtenue de Roche Applied Science (Laval, QC, Canada) et la protéine recombinante du domaine catalytique de la MT1-MMP de Biomol International (Plymouth Meeting, PA).

2.2 Méthodes

2.2.1 Culture cellulaire et transfection

Toutes les cellules utilisées proviennent de l'American Type Culture Collection (ATCC) (Manassas, VA). Les cellules de médulloblastome DAOY ont été cultivées à 37°C sous 5% de CO₂ et 95% d'air dans du milieu EMEM supplémenté avec 10 % de FBS et 1 mM pyruvate. Les cellules de glioblastome U-251 ont été cultivées à 37°C sous 5% de CO₂ dans du DMEM low glucose dans 10% de sérum bovin fœtal. Les cellules de cancer colorectal Caco-2 (Clone C2BBE1) ont été cultivées à 37°C sous 5% de CO₂ dans du DMEM high glucose, 1 mM de pyruvate, 1,5 g/l de NaBicarbonate, 0,01 mg/ml de transferrine et 10% de BCS.

Pour les expériences de transfection, les cellules ont d'abord étéensemencées dans des pétris ou des puits stériles, de façon à obtenir une confluence de 80% après 24 h d'incubation. Les cellules ont ensuite été transfectées à l'aide du réactif de transfection FuGENE HD de Roche Applied Science (Laval, QC, Canada) selon les instructions du fabricant.

2.2.2 Immunoprécipitations et immunodétections

2.2.2.1 Transfection et traitement des cellules

Les cellules ont d'abord étéensemencées dans des pétris de 100 mm, puis transfectées 24 h plus tard. Lors des transfections simples, 8 µg de plasmide ont été utilisés. Pour les transfections doubles, 4 µg de chacun des plasmides ont été utilisés et au besoin, la quantité de plasmide a été ajustée à 8 µg à l'aide du vecteur vide PCDNA 3.1.

2.2.2.2 Lyse cellulaire

24 h après la transfection, les cellules ont été rincées avec du tampon phosphate salin (PBS) 137 mM de NaCl, 2,7 mM de KCl, 10 mM de Na₂HPO₄ et 1,76 mM de KH₂PO₄ pH 7,4 récoltées et lysées, pendant 20 minutes sur glace dans du tampon RIPA contenant 50 mM de Tris-HCl pH 8, 15 mM de NaCl, 1% (p/v) de NP-40, 0,5% (p/v) de deoxycholate de sodium, 0,1% (p/v) de SDS, 1 mM de NaF et 1 mM d'orthovanadate. Les lysats ont ensuite été obtenus en éliminant le matériel insoluble en centrifugeant à 14000 g pendant 20 minutes à 4 °C.

2.2.2.3 Dosage des protéines

Les protéines contenues dans les surnageants de lysats ont été dosées par la méthode du µBCA selon les instructions du distributeur en comparant à diverses concentrations de standards d'albumine sérique de bœuf (BSA).

2.2.2.4 Immunoprécipitation

Pour les immunoprécipitations, des quantités égales de protéines ont été diluées dans du tampon d'immunoprécipitation pour une concentration finale de 10 mM de Tris-HCl pH 7,4, 150 mM de NaCl, 1 % (p/v) de Triton X-100, (p/v) 0,5 % de NP-40, 1 mM d'EDTA, 1 mM d'EGTA, 1 mM de NaF et 1 mM d'orthovanadate. Des anticorps spécifiquement dirigés contre la protéine désirée ont ensuite été ajoutés à cette solution à une concentration de 1-2 µg/ml. Ensuite, 20 µl de billes Sepharose (1:1 PBS) couplées à des protéines A ou G de GE Healthcare (Baie d'Urfe, QC, Canada) ont été ajoutées. Le mélange obtenu a ensuite été agité toute la nuit à 4°C sur plaque sérologique. Le lendemain, les protéines liées de façon non spécifique aux billes ont été lavées avec 4 séries de centrifugation à 10 000 RPM pendant 2 minutes et de lavage de 1 ml de tampon d'immunoprécipitation. Le complexe immunitaire a finalement été dénaturé en chauffant les billes pendant 3 minutes à 100 °C dans 10 µl de tampon de Laemmli contenant 62,5 mM de Tris-HCl pH 6,8, 10 % (v/v) de glycérol, 2% (v/v) de SDS, 5% (v/v) de dithiothréitol et 0,00625% (p/v) de bleu de bromophénol. Les protéines ont été prélevées dans le surnageant du mélange après centrifugation à 10000 RPM pendant 2 minutes.

2.2.2.5 Déglycosylation à la PNGase F

Pour évaluer précisément la masse de CD133, après immunoprécipitation, les protéines ont d'abord été dénaturées 3 min à 100°C dans 40 mM de dithiothréitol, 0,4 % (p/v) de SDS, puis déglycosylées avec 0,5 µl de PNGase F à 37°C pendant 2 heures dans 50 mM de H₂PO₄ pH 7,4, 5 mM d'EDTA et 1% de NP-40. Les échantillons ont ensuite été déposés sur gel.

2.2.2.6 SDS-PAGE et immunobuvardage de type western

Les échantillons de lysats totaux ont été préparés à une concentration de 1 µg/µl. 10 µl de chaque échantillon ont été déposés sur gel SDS-PAGE de 7,5, 10 ou 12 % (p/v) en polyacrylamide, selon le cas. Les gels de préparation étaient préparés comme suit : 7,5, 10, 12 ou 15 % (p/v) d'acrylamide, 0,2% (p/v) de N,N-méthylène-bis-acrylamide dans 0,375 M Tris-HCl pH 8,8 et 0,1 % (p/v) SDS; puis 1µl/ml de N,N,N',N'-teraméthylènediamine (TEMED) et 0,5 mg/ml de persulfate d'ammonium (APS) ont été ajoutés pour amorcer la polymérisation. Le gel d'entassement a ensuite été préparé de la façon suivante : 3,8% (p/v) d'acrylamide, 0,1 % (p/v) de N,N-méthylène-bis-acrylamide, 0,125 M de Tris-HCl pH 6,8, 0,1% (p/v) de SDS; puis 1 µl/ml de TEMED et 0,5 mg/ml d'APS ont été ajoutés. Les protéines furent entassées à 80 V, puis séparées à 120 V dans du tampon d'électrophorèse contenant 192 mM de glycine, 20 mM de Tris et 0,1% de SDS (p/v) jusqu'à ce que le bleu de bromophénol sorte du gel de séparation.

Après la séparation, les protéines contenues dans les gels ont été transférées sur une membrane de PVDF de porosité de 0,45 µm, dans un système de type liquide Mini Trans-Blot, dans du tampon de transfert 96 mM de glycine, 10 mM de Tris, 20% de méthanol et 0,01 % (v/v) de SDS à 100 V pour 60 min. Les membranes ont ensuite été placées toute la nuit à 4°C dans une solution de blocage contenant 3 % (p/v) de BSA dans du TBS-Tween contenant 150 mM de NaCl, 20 mM de Tris-HCl pH 7,5, 0,1 % (v/v) de Tween 20.

2.2.2.7 Immunodétection

Après avoir été bloquées, les membranes de PVDF ont ensuite été incubées pendant 1 heure à température pièce dans une solution d'anticorps primaire diluée à la concentration recommandée par les distributeurs dans du TBS-Tween contenant 3 % (p/v) de BSA et ensuite lavées 4 fois 15 minutes dans du TBS-Tween. Les membranes ont finalement été incubées 1 heure dans une solution d'anticorps secondaire, couplées à la peroxydase de raifort diluée 1/10000 dans du TBS-Tween 3% (p/v) BSA, puis lavées 4 fois 15 minutes dans du TBS-Tween. Finalement, les membranes ont été incubées dans une solution d'ECL et les bandes révélées sur un film photographique Fuji.

2.2.3 Microscopie confocale

Les cellules ont d'abord étéensemencées sur des lamelles placées dans des plaques de 24 puits, puis transfectées 24 h plus tard. Une journée après la transfection, les cellules ont été lavées dans du PBS ainsi qu'après chaque étape de cette expérience, puis fixées toute la nuit dans une solution contenant de 3,7 % (v/v) formaldéhyde à 4 °C. Les cellules ont ensuite été perméabilisées dans une solution de 0,2% de Triton X-100 pendant 5 min. Elles ont ensuite été bloquées dans une solution de TBS-Tween contenant 2% (p/v) de BSA, puis marquées pendant 1 heure à température pièce, dans les solutions d'anticorps primaires dilués dans la solution de blocage. L'anticorps dirigé contre la MT1-MMP (Clone LEM-2/15.8) a été dilué à 1/100 et l'anticorps dirigé contre CD133 (C24B9) à 1/50. Les cellules ont ensuite été incubées pendant 1 heure à température pièce dans les solutions d'anticorps secondaires fluorescents dilués dans la solution de blocage, dilué 1/500 pour l'anti lapin et pour l'anti souris. Les noyaux ont enfin été marqués à l'aide d'une dilution de

Hoescht 5 minutes à température pièce. Les lamelles ont finalement été collées sur des lames à microscopie à l'aide d'Immuno-Fluore mounting medium (MP Biomedicals). Les photos immunofluorescentes ont ensuite été prises sur un microscope confocal Zeiss LSM 510 META.

2.2.4 Séparation des domaines membranaires sur gradient de sucrose discontinu

Les cellules ont d'abord étéensemencées dans des pétris de 100 mm, transfectées le lendemain et finalement grattées 24 h plus tard dans 2 ml de Na_2CO_3 pH 11. Elles ont ensuite été homogénéisées 10 fois au Dounce (tige B), passées au polytron (vitesse 4) 3 fois pendant 10 secondes et soniquées (capacité maximale) 3 fois pendant 15 secondes. L'homogénat a ensuite été transféré dans des tubes à centrifugation et ajusté à 45 % de sucrose avec 2 ml d'une solution contenant 90 % (p/v) sucrose, dans MBS (2,5 mM 2-[N-Morpholino] ethanesulfonic acid et 15 mM de NaCl). L'homogénat a ensuite été recouvert de 4 ml d'une solution de contenant 35 % (p/v) de sucrose, MBS, 0,25 M Na_2CO_3 , puis de 4 ml d'une solution de contenant 5 % (p/v) de sucrose, MBS, 0,25 M Na_2CO_3 . Les domaines membranaires ont ensuite été séparés en centrifugeant à 38 000 RPM sur une ultracentrifugeuse Beckmann (rotor SW41Ti) pendant 18 heures. Les échantillons ont finalement été prélevés par fractions de 1 ml. 10 μl de chaque fraction ont ensuite été déposés sur gel de polyacrylamide.

2.2.5 Clivage *in vitro* à l'aide de protéines recombinantes

2.2.5.1 Construction de la protéine recombinante du N-terminal de CD133

Pour déterminer le site de clivage de CD133 par la MT1-MMP, nous avons construit la protéine GST-CD133 E1, constituée du N-terminal de CD133 fusionné à la protéine glutathione-S-transférase (GST). La protéine de fusion possède un site de clivage à la thrombine, dont la protéolyse permet la séparation de la partie GST et de la partie N-terminale de CD133. Deux autres épitopes ont été ajoutés à la partie N-terminale de CD133 : un épitope Flag à l'extrémité N-terminale et un épitope contenant 6 histidines (6-His) à l'extrémité C-terminale. La protéine recombinante a été construite par amplification par PCR à l'aide de la polymérase PfuUltra de Stratagene (La Jolla, CA) en utilisant le plasmide pCR3.1-Uni-AC133 comme matrice. Un produit de PCR de 426 bp a été amplifié en utilisant les amorces suivantes 5'-AGGGATCCGATTACAAGGATGACGACGATAAG-3' sens et 5'-GGGAATTCATGATGATGATGATGATGTTTCCTCAGGAAGGGCCCATTTC C-3' anti sens. Ce produit a ensuite été digéré par les endonucléases de restriction *Bam*H1 et *Eco*RI, puis purifié sur gel d'agarose en utilisant le QIAquick Gel Extraction Kit de QIAGEN (Mississauga, ON, Canada). Ce fragment a ensuite été inséré à l'aide du Quick Ligation™ Kit de New England Biolabs (Ipswich, MA) dans le vecteur d'expression de protéines GST, pGEX4T-3. Le plasmide résultant codant pour la protéine GST-CD133E1-His a été transformé dans des *Escherichia coli* BL21 RP de Stratagene (La Jolla, CA).

2.2.5.2 Expression dans des bactéries et purification de la protéine GST-CD133E1

Les BL21 ont d'abord étéensemencées dans 500 ml de Luria Broth (LB) de Sigma-Aldrich (Oakville, ON, Canada) contenant 100 µg/ml d'ampicilline de Sigma-Aldrich (Oakville, ON, Canada) et 50 µg/ml de chloramphénicol de USBioAnalyzed (Cleveland, OH). Les bactéries ont été incubées à 37 °C sous agitation à 220 RPM pendant 4 heures, puis 1 mM d'IPTG (Sigma-Aldrich, Oakville, ON, Canada) a été ajouté pour induire l'expression de la protéine, suivi d'une incubation de 2 heures toujours à 37 °C sous agitation à 220 RPM. Les bactéries ont enfin été récoltées par centrifugation à 6000 x g 20 minutes, puis resuspendues dans 20 ml de PBS pour enfin être lysées par sonication. 1% (p/v) de Triton X-100 a ensuite été ajouté au lysat qui a ensuite été incubé pendant 30 minutes à 4 °C sous agitation et le matériel insoluble a été éliminé par centrifugation à 12000 x g pendant 15 minutes.

Les protéines contenues dans le surnageant ont ensuite été incubées 30 minutes dans une colonne contenant 1 volume de billes glutathione-Sepharose™ 4B provenant de GE Healthcare (Baie d'Urfe, QC, Canada). Les billes ont ensuite été lavées 3 fois avec 10 volumes de PBS, puis les protéines contenues dans les billes ont été éluées dans 1 volume de la solution d'éluion contenant 75 mM de Tris-HCl pH 8,8, 100 mM de NaCl, 200 mM de glutathione réduite de Sigma-Aldrich (Oakville, ON, Canada). Le tampon d'éluion a ensuite été remplacé par une dialyse dans le PBS et les protéines ont été clivées à l'aide de la thrombine (GE Healthcare, Baie d'Urfe, QC, Canada) diluée à 0,05 U/µl à 22°C pendant 16 heures pour séparer la protéine GST de la protéine CD133 E1.

Elles ont ensuite été purifiées par leur extrémité contenant le tag 6-His en utilisant une colonne de billes Ni-NTA (QIAGEN, Mississauga, ON, Canada). La solution de protéines a été équilibrée à 5 mM d'imidazole (Sigma-Aldrich, Oakville, ON,

Canada) puis incubée avec 1 volume de billes Ni-NTA pendant 30 minutes. Les billes ont ensuite été lavées 3 fois avec 10 volumes d'une solution contenant 20 mM d'imidazole puis éluées dans 1 volume de la solution d'éluion contenant 250 mM d'imidazole. Le tampon d'éluion a ensuite été remplacé par une dialyse dans 50 mM Tris-HCl pH 7,4.

2.2.5.3 Clivage in vitro et séquençage d'Edman

Pour optimiser la quantité protéique du produit de clivage, 50 µg de la protéine GST-CD133E1-His non clivée à la thrombine ont été utilisés. La protéine a d'abord été concentrée à l'aide de billes glutathione-Sepharose puis clivée à 37°C pendant 12 heures à l'aide de la protéine recombinante du domaine catalytique de la MT1-MMP dans une solution contenant 50 mM Tris-HCl pH 7,4, 10 mM de CaCl₂, 100 mM de NaCl, 0,05 mM de ZnCl₂ et 0,025% (p/v) de Brij 35. Les protéines ont ensuite été séparées sur gel de 15% (p/v) d'acrylamide et transférées dans un tampon de transfert 10 mM de CHAPS (acide N-cyclohexyl-3-aminopropanesulfonic) de Sigma-Aldrich (Oakville, ON, Canada), sur une membrane de PVDF sequi-blot pendant 25 minutes à un ampérage de 0,25 A. La membrane a ensuite été lavée 5 min dans l'eau, colorée 5 min à l'aide d'une solution de bleu de Coomassie 0,1% R250, 50% méthanol, décolorée avec de fréquents lavages dans une solution 10% acide acétique, 50% méthanol en moins de 7 minutes et finalement rincée dans l'eau pendant 10 minutes. La membrane a ensuite été séchée et la bande d'intérêt a été découpée avec un scalpel. La séquence primaire des 5 premiers acides aminés du peptide a été séquencée par la méthode d'Edman (Sheldon Biotechnology Center, Montréal, QC, Canada).

2.2.6 Construction des mutants du N-terminal de CD133 par mutagenèse dirigée

Tous les mutants de la portion N-terminale de CD133 ont été produits à l'aide du kit QuikChange® II Site-Directed Mutagenesis Kit de Stratagene (La Jolla, CA) selon les recommandations du distributeur. Le mutant N33C a été produit à l'aide des amorces suivantes 5'-GATGCTCCTAAGGCTTGGTGTATGAATTGCCTGCAAC-3' sens et 5'-GTTGCAGGCAATTCATAACACCAAGCCTTAGGAGCATC-3' anti sens, le mutant Y34K avec les amorces 5'-GATGCTCCTAAGGCTTGGAATAAAGGAATTGCCTGCAAC-3' sens et 5'-GTTGCAGGCAATTCCTTATTCCAAGCCTTAGGAGCATC-3' anti sens, le mutant K30A avec les amorces 5'-CCTTCATCACAGATGCTCCTGCGGCTTGGAATTATGAA-3' sens 5'-TTCATAATTCCAAGCCGCAGGAGCATCTGTGGATGAAGG-3'. Les mutations ont été authentifiées par séquençage (Bio S&T, Montréal, QC, Canada).

CHAPITRE III

RÉSULTATS

3.1 La MT1-MMP interagit physiquement avec CD133 de manière dépendante de son activité dans des lignées cancéreuses du cerveau.

Bien que les fonctions de CD133 soient encore incertaines, sa présence au front de migration cellulaire (Giebel *et al.*, 2004) et sa présence dans les protrusions de la membrane plasmique (Weigmann *et al.*, 1997) suggèrent un rôle dans l'adhésion et la migration cellulaire. La MT1-MMP peut interagir avec de nombreuses protéines impliquées dans la migration, et tout comme CD133, peut se localiser dans des domaines spécialisés, dans les protrusions de la membrane plasmique, au front de migration (Nakahara *et al.*, 1997; Sato *et al.*, 1997; Itoh *et al.*, 2001; Galvez *et al.*, 2002; Mori *et al.*, 2002; Ouyang *et al.*, 2008). Étant donné les nombreux points communs au niveau de la localisation cellulaire de ces deux protéines, nous avons émis l'hypothèse que la MT1-MMP et CD133 pourraient éventuellement se rencontrer et s'associer dans un même complexe protéique.

Dans le but de déterminer si la MT1-MMP et CD133 peuvent former un complexe protéique, des cellules de lignées de méduloblastome, les DAOY, ont été transfectées avec des plasmides codant pour ces deux protéines. Tel que visualisé à la figure 3.1, la surexpression des deux protéines provoque leur association dans les cellules de lignées DAOY. Nous avons alors tenté la même expérience dans des

cellules de lignées de glioblastome, les U-251, ainsi que dans les cellules de lignées de cellules cancéreuses colorectales, les Caco-2. Comme le montre la figure 3.2, la surexpression des deux protéines provoque également leur association dans les cellules de lignées U-251. Ce n'est cependant pas le cas des cellules de lignées Caco-2 dans lesquels la surexpression des deux protéines n'est pas suffisante pour provoquer leur association (figure 3.3). Il est donc possible que cette interaction soit spécifique aux cellules tumorales du cerveau. Il est également possible que les cellules Caco-2 arborent un phénotype différent au niveau de la régulation spatiale de CD133. Il est également possible que le CD133 endogène présent dans les cellules de lignées Caco-2 empêche l'interaction des protéines transfectées par compétition. On peut constater sur chacune de ces figures la présence endogène de la MT1-MMP sous sa forme active (57 kDa) et sauf dans les U-251, la présence de la proMT1-MMP (63 kDa) qui augmentent toutes les deux lorsque l'on transfecte les cellules avec l'ADN de MT1-MMP (WT) ou de son mutant catalytiquement inactif (E240A).

Lorsque les formes sauvages de la MT1-MMP (WT) et de CD133 (WT) sont surexprimées, on peut constater la présence de la forme immature de 105 kDa de CD133 dans l'immunoprécipitat de la MT1-MMP, tandis que lorsqu'on surexprime le mutant catalytiquement inactif de la MT1-MMP (E240A), on peut également observer sa forme mature de 116 kDa. De plus, la quantité cellulaire de la forme mature de CD133 diminue fortement dans les DAOY et très légèrement dans les U-251 en présence de la MT1-MMP, suggérant la possibilité mais pas la certitude que l'activité protéolytique de la MT1-MMP mènerait à la dégradation de CD133.

Etant donné la dépendance de ces événements vis-à-vis de l'activité catalytique de la MT1-MMP, cela suggère que l'élément déclencheur de ces phénomènes pourrait être un clivage de CD133 par la MT1-MMP, malgré l'absence de produits de dégradation observable.

3.2 L'interaction entre la MT1-MMP et CD133 débute dans le réticulum endoplasmique ou l'appareil de Golgi avant la maturation complète des deux protéines

Nous avons ensuite voulu déterminer dans quel compartiment cellulaire l'interaction entre la MT1-MMP et CD133 pouvait être initiée, ainsi que vérifier si la localisation cellulaire de CD133 ou du complexe la reliant à MT1-MMP pourrait être affectée par l'activité catalytique de MT1-MMP ou de son absence. Il a été démontré que CD133 pouvait se localiser dans des radeaux lipidiques non cavéolaires (Roper *et al.*, 2000), au contraire de la MT1-MMP qui, quant à elle, peut se localiser dans les cavéoles (Annabi *et al.*, 2001; Puyraimond *et al.*, 2001; Remacle *et al.*, 2003; Labrecque *et al.*, 2004). Il était cependant possible que l'interaction entre ces deux protéines entraîne une relocalisation cavéolaire de CD133. Nous avons donc voulu vérifier la présence de CD133 dans les cavéoles par isolation des domaines membranaires sur gradient de sucrose, une technique qui permet de séparer les domaines en fonction de leur densité. La figure 3.4 A montre que CD133 et la MT1-MMP ont tous les deux une présence accentuée dans les fractions contenant la protéine cavéoline-1, un marqueur des cavéoles (fraction 4 et 5). Cependant, comme visualisé à la figure 3.4 B, les deux protéines ne sont pas associées dans cette fraction. Deux possibilités peuvent expliquer ce résultat : soit CD133 se localise bien dans les cavéoles mais n'y interagit plus avec la MT1-MMP, soit CD133 se localise dans des radeaux lipidiques de densité similaire aux cavéoles.

Dans les cellules surexprimant CD133 ou également la MT1-MMP, on remarque aussi une grande proportion de CD133 dans des fractions plus denses (fractions 8 et 9) (figure 3.4 A). Ces fractions de haute densité contiennent la forme immature de CD133, normalement localisée dans le réticulum endoplasmique ou dans des compartiments précoces de l'appareil de Golgi (Corbeil *et al.*, 1999), ainsi que la pro

forme de la MT1-MMP qui n'existe normalement qu'avant de perdre son prodomaine dans l'appareil de Golgi (Mazzone *et al.*, 2004; Remacle *et al.*, 2006), signifiant que ces compartiments sont contenus dans ces fractions. La figure 3.4 B montre que l'immunoprécipitat de CD133 de la fraction 9, lorsque l'on surexprime les deux protéines, contient seulement la proforme de la MT1-MMP (63 kDa) avec quelques très faibles traces de sa forme active (57 kDa), suggérant que CD133 peut déjà interagir avec la MT1-MMP avant son activation dans les compartiments du réticulum endoplasmique ou de l'appareil de Golgi.

La délétion de la queue cytoplasmique de CD133 mûrine cause une diminution de sa maturation accompagnée d'une rétention de sa forme immature du réticulum endoplasmique (Corbeil *et al.*, 1999). Le même phénomène se produit avec la protéine humaine comme le démontre le profil du mutant CD133 CA52 à la figure 3.5. De façon intéressante, la délétion de la queue cytoplasmique de CD133 a pour effet d'augmenter l'intensité de son interaction tant avec la forme active qu'inactive de la MT1-MMP, ce qui est en accord avec l'idée d'une interaction au niveau du réticulum endoplasmique ou du Golgi. De plus, on peut constater qu'en comparaison avec le CD133 de type sauvage, l'augmentation de l'interaction entre CD133 CA52 avec la MT1-MMP de type sauvage entraîne une diminution bien plus forte de la quantité cellulaire totale de la forme mature de CD133, ce qui est une conséquence logique de l'augmentation de leur interaction.

À la lumière de ces résultats, nous avons voulu confirmer la localisation cellulaire de cette interaction par microscopie confocale, visualisé à la figure 3.6. La colocalisation périnucléaire de CD133 avec la MT1-MMP de type sauvage endogène et exogène suggère également la possibilité que cette interaction puisse se produire au réticulum endoplasmique, il n'est toutefois pas possible de l'affirmer car il pourrait s'agir d'un autre compartiment périnucléaire des cellules. L'expression du mutant

catalytiquement inactif de la MT1-MMP E240A induit l'accumulation de CD133 au pourtour de la membrane plasmique sans orientation particulière, possiblement induite par l'incapacité de la MT1-MMP à induire sa dégradation.

3.3 La MT1-MMP clive CD133 de manière spécifique au site ³⁰KAWN↓Y³⁴.

Dans le but d'examiner la possibilité d'une protéolyse de CD133 par la MT1-MMP, nous avons d'abord vérifié dans un contexte non cellulaire si le domaine catalytique de la MT1-MMP seul pouvait cliver le CD133 cellulaire. Comme le montre la figure 3.7, autant le CD133 exogène de cellules DAOY transfectées, que le CD133 endogène de cellules Caco-2, subissent une légère diminution de poids moléculaire de quelques kDa lorsque mis en présence de la protéine recombinante du domaine catalytique de la MT1-MMP, reflétant un clivage protéolytique très proche de l'une de ses extrémités, donc soit au N-terminal, soit au C-terminal. Un clivage au N-terminal serait toutefois plus probable, car cette partie est extracellulaire et peut donc être exposée au domaine catalytique de la MT1-MMP, contrairement à son C-terminal (Miraglia *et al.*, 1997; Yin *et al.*, 1997).

Nous avons donc vérifié ces possibilités dans un contexte cellulaire. Pour ce faire, nous avons tenté de visualiser la protéine clivée au niveau cellulaire en éliminant ses sucres à l'aide de la PNGaseF, une enzyme dont l'activité est capable d'éliminer les groupements glycosyles de CD133 (Corbeil *et al.*, 1999). Comme le montre la figure 3.8, la présence de la MT1-MMP dans des cellules exprimant CD133 ayant un épitope Flag en son N-terminal, induit l'apparition d'une forme de CD133 de poids moléculaire inférieur (flèche noire) à la protéine complète (flèche blanche), qui peut être observée à l'aide d'anticorps dirigés contre son C-terminal ou sa seconde boucle extracellulaire, mais pas dirigés contre l'épitope Flag en N-terminal. La MT1-MMP

clive donc bien CD133 en N-terminal. Il nous fut cependant impossible, malgré de nombreux efforts, d'observer l'autre segment issu de ce clivage protéolytique.

Dans l'optique de déterminer plus précisément le site de clivage de la MT1-MMP, nous avons construit et purifié une protéine recombinante du domaine N-terminal de CD133 (CD133 E1) dans le but de la cliver *in vitro* et de séquencer les produits obtenus par la méthode d'Edman. La figure 3.9 montre que la protéine recombinante CD133 E1 est bel et bien clivée par le domaine catalytique de la MT1-MMP, ce qui engendre l'apparition d'une forme de poids moléculaire plus faible (en accord avec celle des résultats des figures 3.2 et 3.3). La chélation du zinc et du calcium nécessaire à l'activité de la MT1-MMP par l'EDTA prévient cette protéolyse, démontrant que la dégradation *in vitro* est spécifiquement due à l'activité catalytique de la MT1-MMP. La figure 3.10 montre le résultat du clivage de la protéine recombinante (GST-CD133 E1) en bleu de Coomassie, ainsi que le site de clivage résultant identifié par la méthode d'Edman. Il est à noter que la solution commerciale de la protéine recombinante du domaine catalytique de la MT1-MMP contenait quelques contaminants protéiques, dont la bande identifiée comme telle dans la condition contenant cette solution à la figure 3.10. La séquence obtenue, YELPA, correspond aux acides aminés 34 à 38 du domaine N-terminal de CD133 (Miraglia *et al.*, 1997; Yin *et al.*, 1997), révélant le site de clivage de CD133 par la MT1-MMP : $^{30}\text{KAWN}\downarrow\text{Y}^{34}$, représenté à la figure 3.11. Cette séquence ressemble légèrement à la séquence consensus $\text{RXXX}\downarrow(\text{Hy})(\text{Po})$ où l'arginine en position P4 peut s'interchanger pour une lysine. Sa comparaison aux sites de clivages des protéines connus n'a pas non plus été très fructueuse, cependant cela peut être normal, considérant le manque général de ressemblance entre les sites de clivages des substrats connus de la MT1-MMP.

Nous avons ensuite voulu confirmer que la MT1-MMP cible bien ce site au niveau de la protéine complète de CD133. Pour ce faire, nous avons introduit diverses mutations à proximité du site, en nous fiant sur des données issues de la littérature. Pour plus de clarté, nous indiquerons la position des acides aminés entourant le site de clivage par un nombre indiquant leur distance au site accompagné d'un Px pour les acides aminés le précédant et un Px' pour ceux le suivant. Par exemple la position P4 correspond au quatrième acide aminé précédant le site, soit la lysine 30. Le mutant N33C a été construit à cause de la rareté de la présence d'une cystéine à la position P1 dans les substrats de la MT1-MMP. Le mutant Y34K quant à lui, a été construit en opposition à la présence préférentielle d'un acide aminé hydrophobe à la position P1' (Ohkubo *et al.*, 1999; Kridel *et al.*, 2002). Le mutant K30A a été construit pour vérifier son appartenance à la catégorie de substrat de la MT1-MMP qui nécessite la présence d'une arginine, d'une lysine ou d'une tyrosine à la position P4 (Kridel *et al.*, 2002). Malheureusement, aucune de nos tentatives n'a été fructueuse. Les résultats des mutants de CD133 N33C et Y34K sont illustrés à la figure 3.12. Ils ne montrent aucune inhibition, mais, surtout, il semble que le N33C, semble pourrait interagir davantage avec la MT1-MMP. Le mutant K30A n'a pas donné de meilleurs résultats. Nous avons également tenté de construire deux autres mutants constitués uniquement d'alanines pour le premier entre les positions P4 et P1' (30(5A)34) et pour le second entre les positions P2 et P1' (32(3A)34) ce qui s'est avéré impossible à obtenir. Nous n'avons donc malheureusement pas pu confirmer que le site de clivage au niveau cellulaire correspondait à celui obtenu *in vitro*.

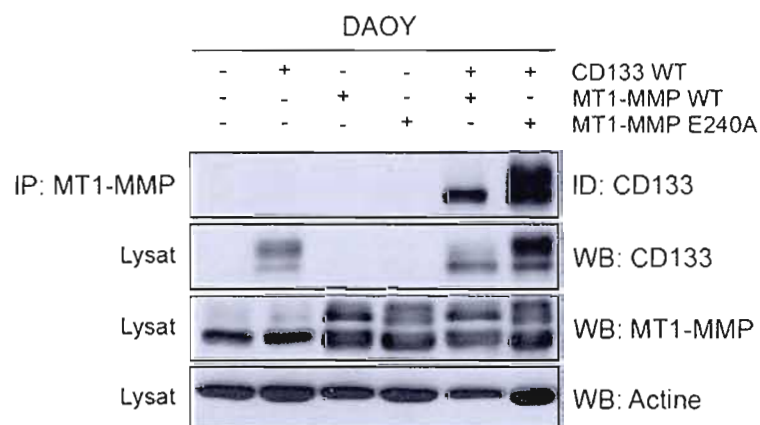


Figure 3.1 : La MT1-MMP interagit avec CD133 de façon dépendante de son activité dans la lignée cancéreuse de médulloblastome DAOY. Des cellules de médulloblastome DAOY ont été transfectées comme indiqué dans le matériel et méthodes avec les différentes combinaisons de plasmides indiquées. Vingt-quatre heures plus tard, les cellules ont été lysées et des quantités égales de protéines ont été mises en présence d'anticorps spécifiquement dirigés contre la MT1-MMP et de billes sépharose couplées aux protéines G. La présence de CD133 dans le complexe immun et les niveaux d'expression de chaque protéine ont ensuite été vérifiés par SDS-PAGE suivi d'immunobuvardages de type western (n=3).

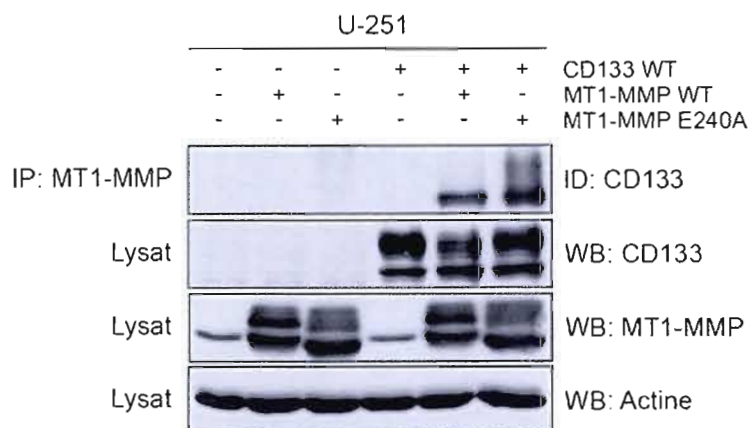


Figure 3.2 : La MT1-MMP interagit avec CD133 de façon dépendante de son activité dans la lignée cancéreuse de glioblastome U-251. Des cellules de glioblastome U-251 ont été transfectées avec les différentes combinaisons de plasmides indiquées. Vingt-quatre heures plus tard, les cellules ont été lysées et des quantités égales de protéines ont été mises en présence d'anticorps spécifiquement dirigés contre la MT1-MMP et de billes sépharose couplées aux protéines G. La présence de CD133 dans le complexe immun et les niveaux d'expression de chaque protéine ont ensuite été vérifiés par SDS-PAGE suivi d'immunobuvardages de type western (n=3).

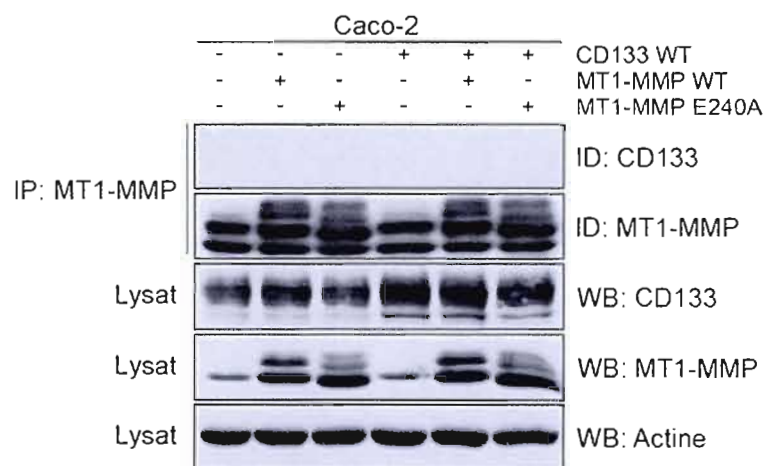


Figure 3.3 : La MT1-MMP n'interagit pas avec CD133 dans la lignée cancéreuse colorectale Caco-2. Des cellules cancéreuses colorectale Caco-2 ont été transfectées avec les différentes combinaisons de plasmides indiquées. Vingt-quatre heures plus tard, les cellules ont été lysées et des quantités égales de protéines ont été mises en présence d'anticorps spécifiquement dirigés contre la MT1-MMP et de billes sépharose couplées aux protéines G. La présence de CD133 dans le complexe immun et les niveaux d'expression de chaque protéine ont ensuite été vérifiés par SDS-PAGE suivi d'immunobuvardages de type western (n=3).

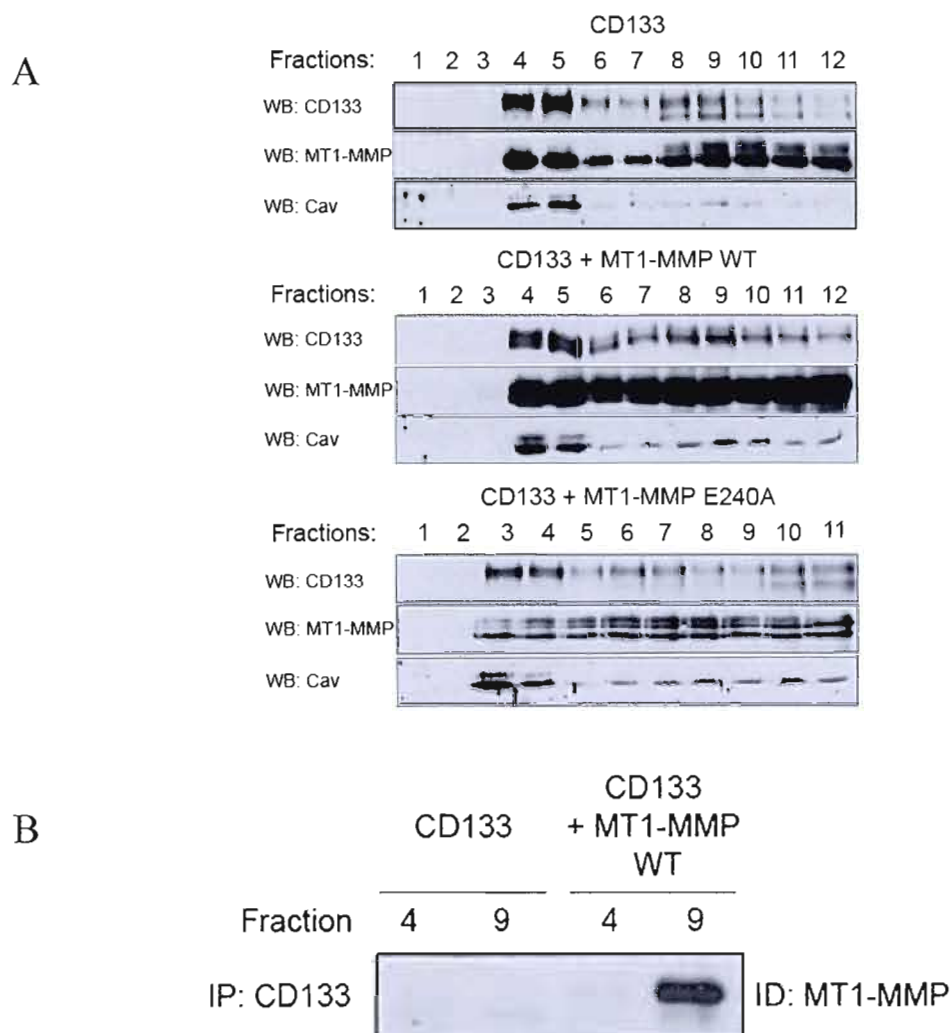


Figure 3.4 : La proMT1-MMP interagit avec CD133 avant son activation dans l'appareil de Golgi. Des cellules de médulloblastome DAOY ont été transfectées avec les différentes combinaisons de plasmides indiquées. Vingt-quatre heures plus tard, les cellules ont été récoltées et les compartiments cellulaires ont été séparés selon leurs densités, en fractions sur gradient de sucrose discontinu. La présence de CD133, de la MT1-MMP et de la Cav-1 a été contrôlée dans chaque fraction par SDS-PAGE suivi d'immunobuvardages de type western (n=2) (A). Des volumes égaux des fractions 4 cavéolaires et 9 des conditions de CD133 seul et de CD133 cotransfecté avec MT1-MMP (WT) contenant les protéines immatures ont été mis en présence d'anticorps spécifiquement dirigés contre CD133 et de billes sépharose couplées aux protéines A. La présence de la MT1-MMP dans le complexe immunitaire a ensuite été vérifiée par SDS-PAGE suivi d'immunobuvardages de type western (n=2) (B).

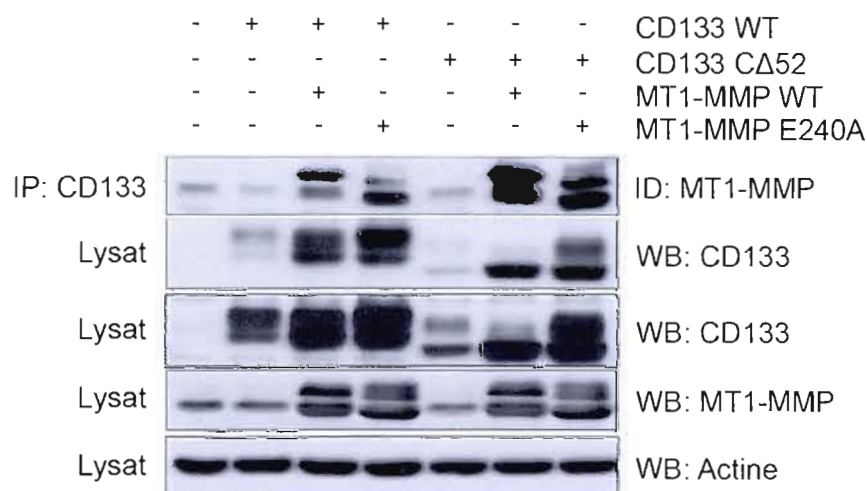


Figure 3.5 : La délétion de la queue cytoplasmique de CD133 diminue l'efficacité de sa maturation et augmente son interaction avec la MT1-MMP. Des cellules de médulloblastome DAOY ont été transfectées avec les différentes combinaisons de plasmides indiquées. Vingt-quatre heures plus tard, les cellules ont été lysées et des quantités égales de protéines ont été mises en présence d'anticorps spécifiquement dirigés contre CD133 et de billes sépharose couplées aux protéines A. La présence de la MT1-MMP dans le complexe immun et les niveaux d'expression de chaque protéine ont ensuite été vérifiés par SDS-PAGE suivi d'immunobuvardages de type western (n=3).

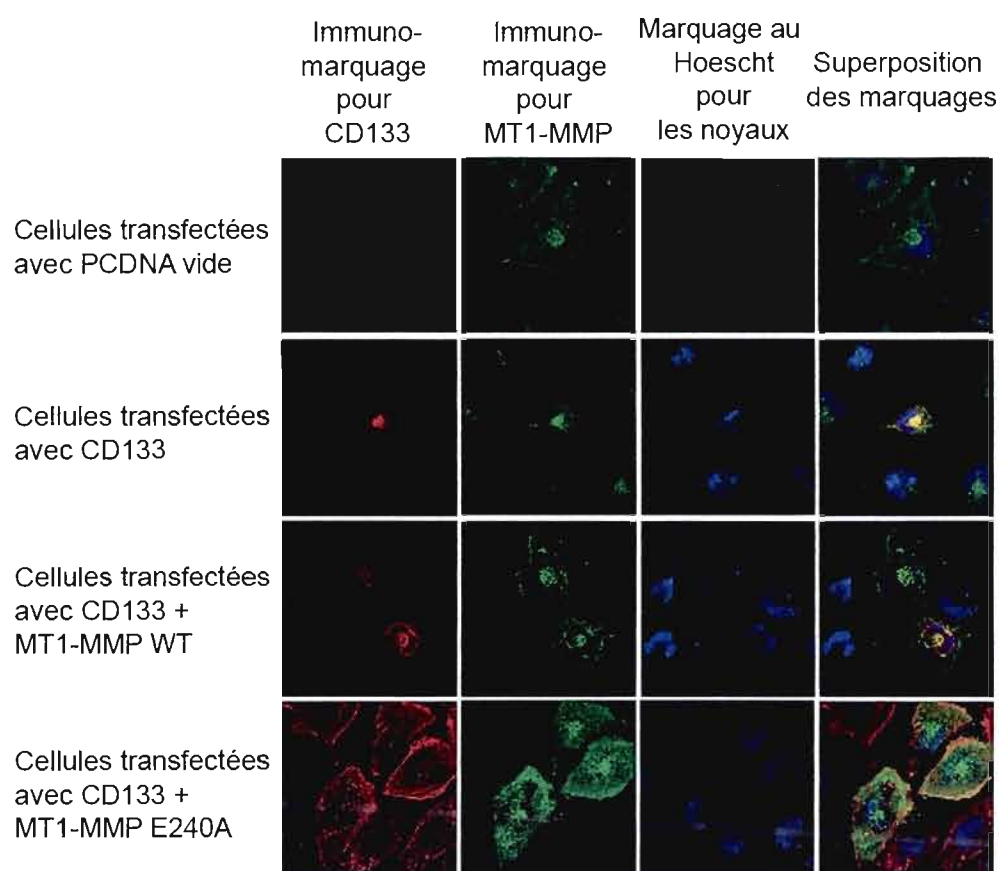


Figure 3.6 : La MT1-MMP interagit avec CD133 dans le réticulum endoplasmique. Des cellules de médulloblastome DAOY ont été transfectées avec les différentes combinaisons de plasmides indiquées. Vingt-quatre heures plus tard, les cellules ont été traitées tel que mentionné dans le matériel et méthodes. L'immunofluorescence a été visualisée et photographiée à l'aide d'un microscope confocal à un grossissement de 63X/1.4 (n=3).

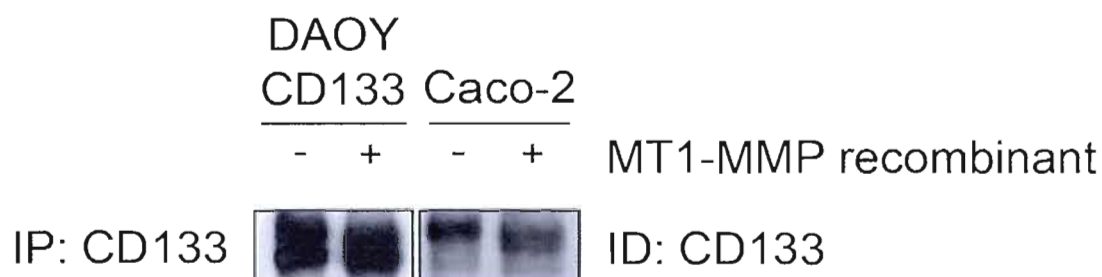


Figure 3.7 : La MT1-MMP clive CD133 cellulaire endogène et exogène. Des cellules de médulloblastome DAOY ont été transfectées avec l'ADN de CD133, et des cellules Caco-2 ont étéensemencées simultanément sans être transfectées. Vingt-quatre heures plus tard, les cellules ont été lysées et des quantités égales de protéines ont été mises en présence d'anticorps spécifiquement dirigés contre CD133 et de billes sépharose couplées aux protéines A. CD133 présent dans l'immunoprécipitat a ensuite été digéré par 0,1 µg de la protéine recombinante du domaine catalytique de la MT1-MMP comme le décrit le matériel et méthode. Le poids moléculaire de CD133 a ensuite été contrôlé par SDS-PAGE suivi d'immunobuvardages de type western (n=3).

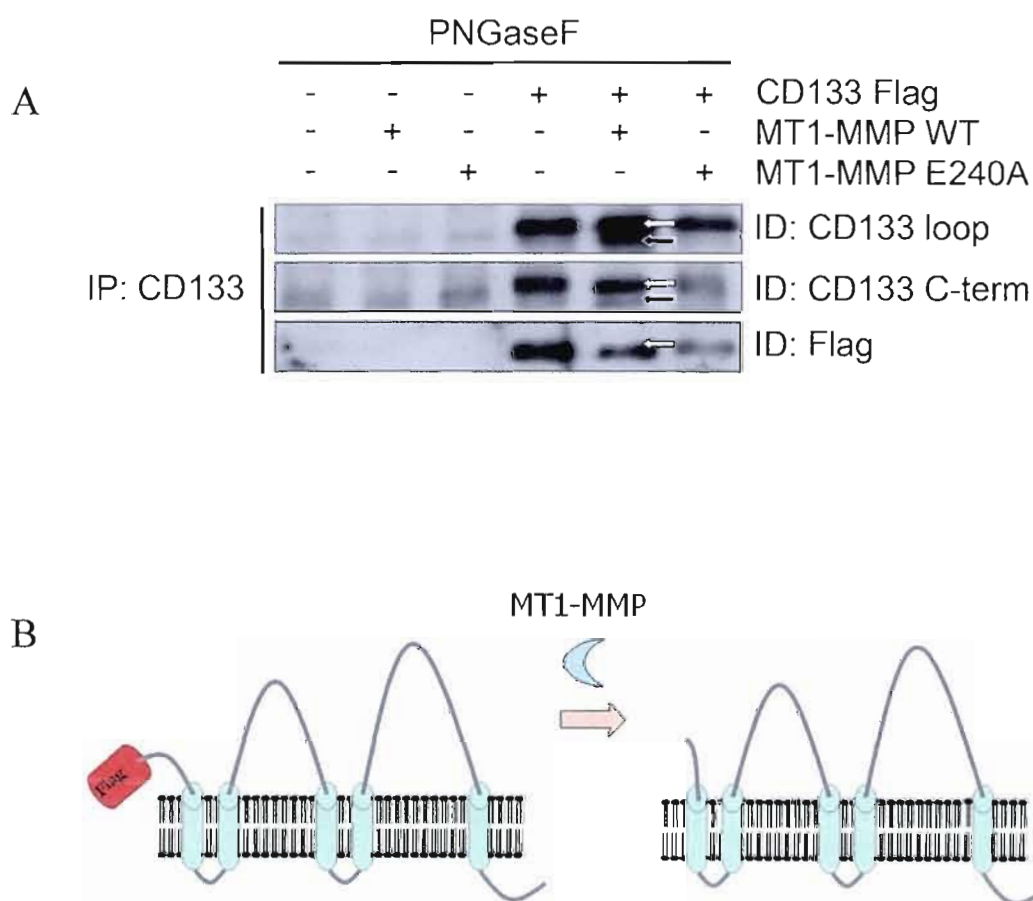


Figure 3.8 : La MT1-MMP clive CD133 cellulaire à son extrémité N-terminale. Des cellules de médulloblastome DAOY ont été transfectées avec les différentes combinaisons de plasmides indiquées. Vingt-quatre heures plus tard, les cellules ont été lysées et des quantités égales de protéines ont été mises en présence d'anticorps spécifiquement dirigés contre CD133 et de billes sépharose couplées aux protéines A toute la nuit. L'immunoprécipitat a ensuite été digéré par la PNGaseF pendant 2 h à 37°C comme décrit dans le matériel et méthodes. Le poids moléculaire de CD133 fut ensuite contrôlé par SDS-PAGE suivi d'immunobuvardages de type western (n=2) (A). La protéine résultante est illustrée (B).

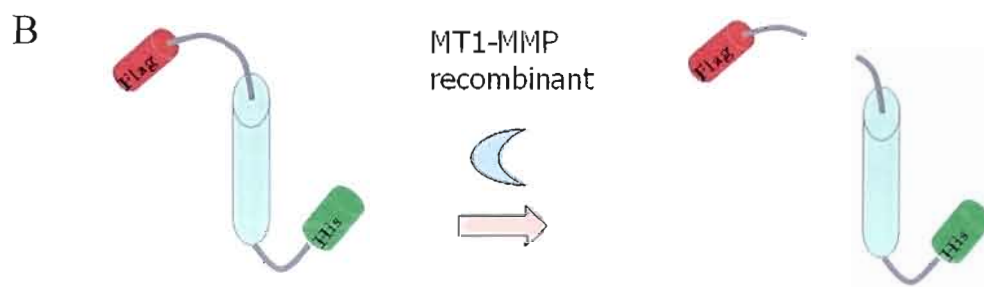
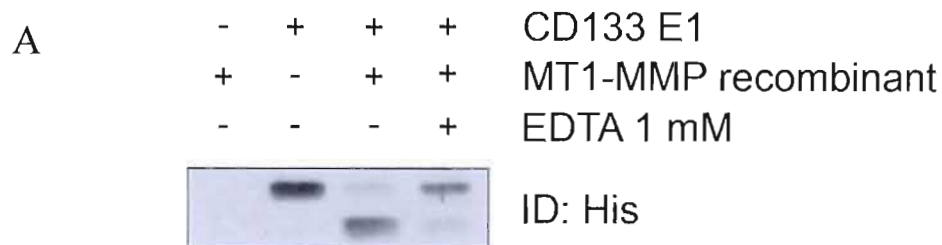


Figure 3.9 : Le domaine catalytique de la MT1-MMP clive la protéine recombinante du domaine N-terminal de CD133 : CD133 E1. 1 μ g de la protéine recombinante CD133 E1 et 0,1 μ g de la protéine recombinante du domaine catalytique de la MT1-MMP furent incubés pendant 2 h à 37°C en présence ou en absence d'EDTA 1 mM. Le poids moléculaire de la protéine résultante a ensuite été contrôlé par SDS-PAGE suivi d'immunobuvardages de type western (n=3) (A). La protéine résultante est illustrée (B).

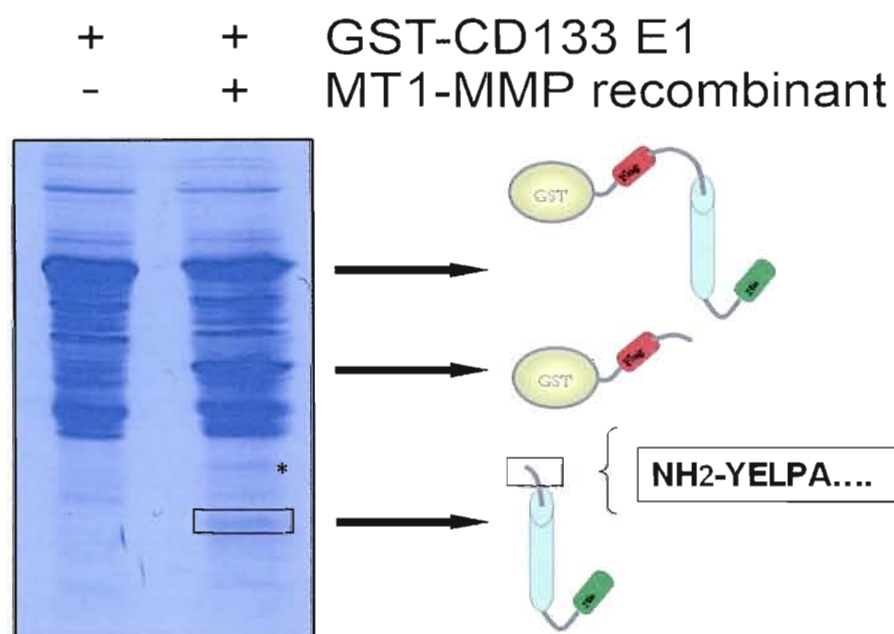


Figure 3.10 : Le domaine catalytique de la MT1-MMP clive la protéine GST-CD133 E1 découvrant une nouvelle extrémité N-terminale: YELPA. 50µg de la protéine recombinante GST-CD133 E1 a d'abord été concentré à l'aide de billes glutathione-Sepharose, puis incubé 24 h à 37°C en présence de 0,5 µg de la protéine recombinante du domaine catalytique de la MT1-MMP. La protéine résultante a ensuite été séparée par SDS-PAGE puis transférée sur une membrane de PVDF sequi-blot et colorée au bleu de coomassie (n=3). La protéine identifiée comme l'extrémité C-terminale du produit de clivage (encadré) fut ensuite séquencée par la méthode d'Edman (n=1). Une protéine contaminante provenant de la solution de la protéine recombinante du domaine catalytique de la MT1-MMP a également été identifié (*).

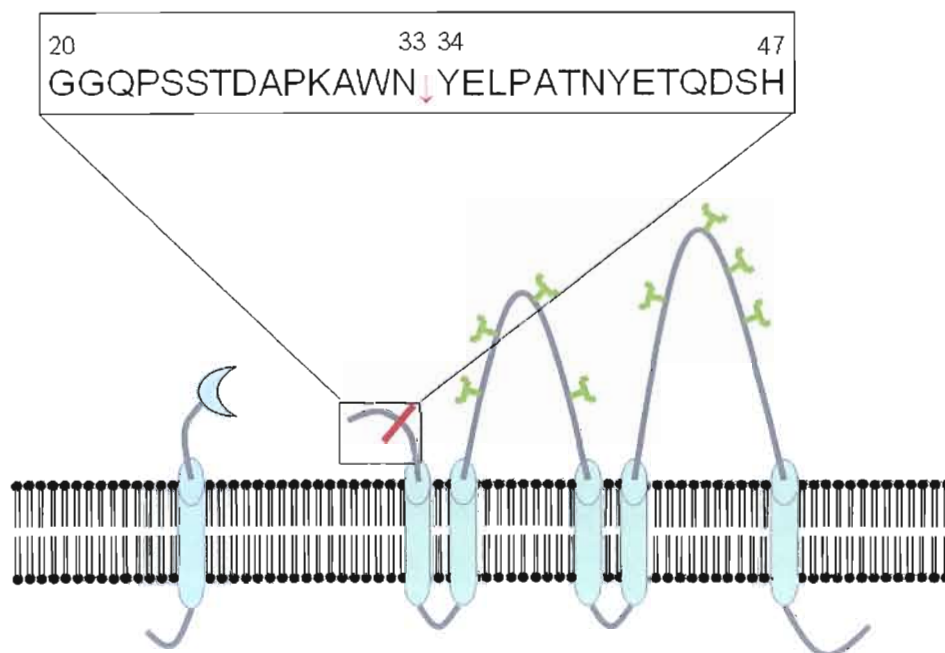


Figure 3.11: La MT1-MMP clive le domaine N-terminal de CD133 au site 30KAWN↓Y34. La superposition de la séquence identifiée par séquençage d'EDMAN, YELPA et de la séquence primaire de CD133 révèle le site de clivage de CD133 par la MT1-MMP.

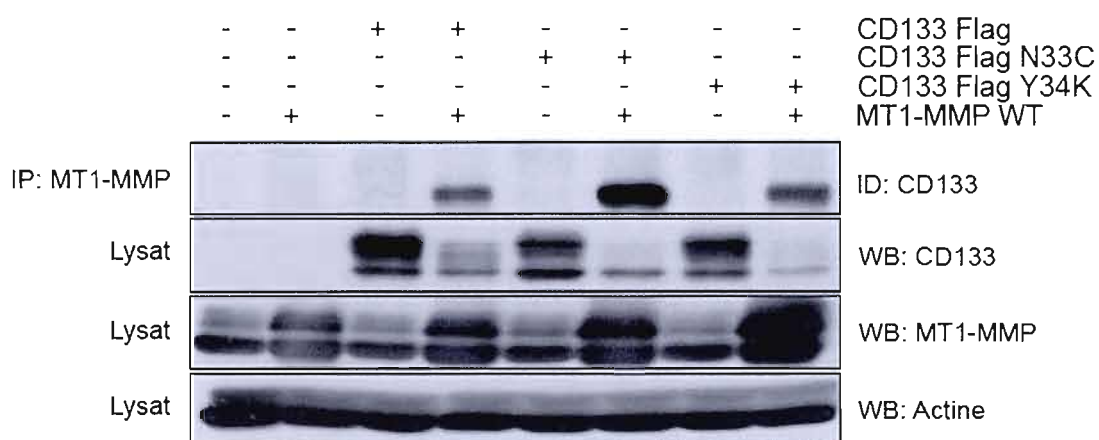


Figure 3.12 : Les mutations N33C et Y34K n'empêchent pas le clivage de CD133. Des cellules de médulloblastome DAOY ont été transfectées avec les différentes combinaisons de plasmides indiquées. Vingt-quatre heures plus tard, les cellules ont été lysées et des quantités égales de protéines ont été mises en présence d'anticorps spécifiquement dirigés contre la MT1-MMP et de billes sépharose couplées aux protéines G. La présence de CD133 dans le complexe immun et les niveaux d'expression de chaque protéine ont ensuite été vérifiés par SDS-PAGE suivi d'immunobuvardages de type western (n=2).

CHAPITRE IV

DISCUSSION

La présence de CD133 dans les CSCs de multiples lignées cellulaires a été énormément étudiée dans les dernières années, mais peu d'informations sont disponibles sur sa régulation ou encore sur ses effets sur les fonctions cellulaires. Les données récentes sur son statut de glycosylation particulier aux CSCs démontrent la complexité du profil d'expression moléculaire de cette protéine (Bidlemaier *et al.*, 2008; Kemper *et al.*, 2010; Sgambato *et al.*, 2010). Il est fort probable que ses fonctions ne pourront être comprises que lorsque plus d'informations seront disponibles sur les mécanismes et complexes protéiques mis en jeu dans la régulation de sa localisation cellulaire et de ses modifications post traductionnelles, telle que sa glycosylation très complexe. Pour la première fois, nos données démontrent qu'une interaction physique directe de CD133 avec une autre protéine, la MT1-MMP, peut mener à une nouvelle modification post traductionnelle, ainsi qu'à une régulation de son expression non pas au niveau génétique mais bien au niveau protéique. Cela n'a cependant été démontré qu'*in vitro*.

Nos données *in vitro* indiquent que l'interaction de la MT1-MMP avec CD133 peut entraîner dans le clivage du premier domaine extracellulaire de CD133, à son extrémité N-terminale au site ³⁰KAWN↓Y³⁴, ce qui entraîne la diminution de la quantité cellulaire détectable de CD133.

4.1 Implication du clivage du domaine N-terminal de CD133 dans son interaction membranaire

Du à sa localisation dans les protrusions de la membrane plasmique et à sa capacité d'interagir avec le cholestérol membranaire, il a été proposé que CD133 puisse jouer un rôle dans l'organisation membranaire de certains domaines membranaires (Corbeil *et al.*, 2001). Il a récemment été découvert que la séquence ³⁶LPATNYETQDSHKAG⁵⁰ du N-terminal de CD133 est capable de lier le ganglioside GM1. De plus une autre séquence ¹⁸²QVRTRIKRSRKLADS¹⁹⁶, cette fois contenue au début de la première grande boucle extracellulaire, peut également se lier à GM1, mais aussi à GD3 (Taieb *et al.*, 2009). Il est possible, étant donné la localisation topologique très proche de ces deux séquences, qu'elles puissent coopérer pour créer un site commun de liaisons aux gangliosides (Taieb *et al.*, 2009). La signification de cette interaction est encore obscure; cependant, la mise en excès en GM1 de cellules Caco-2 cause la diminution de sa localisation membranaire au profit d'une localisation périnucléaire (Taieb *et al.*, 2009).

Le site de clivage de CD133 par la MT1-MMP, ³⁰KAWN↓Y³⁴ précède la première séquence de liaison à GM1 de seulement 3 acides aminés dans la séquence primaire de CD133 (Miraglia *et al.*, 1997; Yin *et al.*, 1997). Par conséquent, lors de la protéolyse du domaine N-terminal de CD133, ce domaine devient la nouvelle extrémité N-terminale. Il est possible que la chaîne d'acides aminés G²⁰ à N³³ possède une fonction d'encombrement stérique sur les sites de liaisons aux gangliosides, et que son clivage augmente leurs capacités d'interaction avec GM1, GD3 ou même d'autres types de gangliosides. Comme le contenu en gangliosides est très variable d'un domaine membranaire à un autre (Sonnino *et al.*, 2007), cette modification de l'affinité aux gangliosides pourrait induire la relocalisation de CD133 dans des domaines intracellulaires responsables de sa dégradation. Bien que la validation d'un

tel mécanisme nécessite davantage de preuves, il reste très plausible si l'on en croit l'ensemble de ces résultats. Il serait intéressant d'observer en microscopie confocale les variations de colocalisation de CD133 avec certains gangliosides comme GM1 et GD3, ou même avec les marqueurs d'autres domaines membranaires en présence ou en absence de la MT1-MMP de type sauvage (WT) ou de son mutant catalytiquement inactif (E240A).

Il est également possible que les acides aminés G²⁰ à N³³ possèdent une séquence particulière pouvant influencer son ciblage dans des domaines membranaires particuliers, et que son absence empêche CD133 d'atteindre ces domaines. Cette éventualité est également plausible, car la délétion complète du premier domaine extracellulaire du CD133 murin induit une localisation intracellulaire accompagnée d'une incapacité à rejoindre la membrane plasmique (Corbeil *et al.*, 1999).

4.2 La MT1-MMP comme régulateur de la fonction d'organisation membranaire de CD133

Les résultats provenant de notre modèle suggèrent que l'interaction entre ces deux protéines peut se produire dans les compartiments intracellulaires de la cellule, mais cela ne signifie pas que CD133 et la MT1-MMP ne puissent pas se rencontrer à la membrane cellulaire. Nos résultats suggèrent également que lorsque CD133 est clivé par la MT1-MMP il s'ensuit une diminution de la quantité cellulaire de la forme mature de CD133, mais que la MT1-MMP ne peut ni cliver, ni induire la diminution d'expression de la forme immature de CD133, signifiant que le clivage est principalement dépendant du statut de glycosylation de CD133 mais pas nécessairement de la localisation cellulaire du complexe. Il faut toutefois noter que ces résultats n'ont été démontrés qu'*in vitro*. Il est donc possible que la MT1-MMP

puisse rencontrer CD133 à la membrane cellulaire et induise son internalisation, suivie de sa dégradation, mettant ainsi un terme aux fonctions de CD133 à la membrane.

CD133 a été proposé comme organisateur de domaines spécialisés de la membrane plasmique (Corbeil *et al.*, 2001). Si tel est le cas, la relocalisation et la dégradation de CD133 induites par la MT1-MMP conduiraient au démantèlement de ces domaines. Il a également été proposé que de par cette fonction d'organisateur membranaire et de sa présence au front de migration cellulaire, CD133 puisse jouer un rôle dans la polarité et la migration cellulaire, via des interactions cellule-cellule ou cellule-matrice (Giebel *et al.*, 2004) et étant donné cette localisation, CD133 pourrait elle-même être une protéine d'adhésion. Le démantèlement de ces domaines au front de migration pourrait favoriser la migration en diminuant l'adhésion due à des protéines d'adhésion qu'ils pourraient contenir. Ce scénario est vraisemblable étant donné que la MT1-MMP promeut déjà la migration cellulaire par un tel mécanisme, en clivant la protéine d'adhésion CD44 (Kajita *et al.*, 2001; Mori *et al.*, 2002; Nakamura *et al.*, 2004).

CHAPITRE V

CONCLUSION

Dans cette étude, nous démontrons pour la première fois que CD133 peut interagir physiquement avec une métalloprotéase matricielle, la MT1-MMP. À l'aide de techniques d'isolation membranaire et de microscopie confocale nous avons déterminé que cette interaction prend place au niveau du réticulum endoplasmique avant même la maturation complète des deux protéines. Il ne faut cependant pas exclure la possibilité que dans un contexte différent, la MT1-MMP et CD133 pourraient se rencontrer à la membrane plasmique plutôt qu'au réticulum endoplasmique. Nos résultats suggèrent que la conséquence directe de leur interaction pourrait être le clivage du domaine N-terminal de CD133 au site ³⁰KAWN↓Y³⁴ sous l'effet de l'activité catalytique de la MT1-MMP. Suite à ce clivage, la quantité cellulaire de CD133 semble diminuer grandement, toutefois il n'est pas possible d'établir le devenir exact de CD133 suite à ces événements. Cependant, cette interaction pourrait être un moyen de contrôle menant à la dégradation de CD133. Bien que les conséquences cellulaires de ces phénomènes n'aient pas encore été clarifiées, il est probable que ceux-ci soient reliés à l'adhésion et à la migration des CSCs. Des recherches plus approfondies sur le sujet pourraient mener à une meilleure compréhension de la biologie des CSCs, et contribueraient à améliorer le pronostic des patients atteints de cancer.

BIBLIOGRAPHIE

- Al-Hajj, M., M. S. Wicha, A. Benito-Hernandez, S. J. Morrison et M. F. Clarke, 2003. "Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells." *Proc Natl Acad Sci USA*, vol. 100, 7, p. 3983-8.
- Ambudkar, S. V., S. Dey, C. A. Hrycyna, M. Ramachandra, I. Pastan et M. M. Gottesman, 1999. "Biochemical, cellular, and pharmacological aspects of the multidrug transporter." *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, vol. 39, p. 361-98.
- Ambudkar, S. V., C. Kimchi-Sarfaty, Z. E. Sauna et M. M. Gottesman, 2003. "P-glycoprotein: from genomics to mechanism." *Oncogene*, vol. 22, 47, p. 7468-85.
- Anilkumar, N., T. Uekita, J. R. Couchman, H. Nagase, M. Seiki et Y. Itoh, 2005. "Palmitoylation at Cys574 is essential for MT1-MMP to promote cell migration." *Faseb J*, vol. 19, 10, p. 1326-8.
- Annabi, B., M. Lachambre, N. Bousquet-Gagnon, M. Page, D. Gingras et R. Beliveau, 2001. "Localization of membrane-type 1 matrix metalloproteinase in caveolae membrane domains." *Biochem J*, vol. 353, Pt 3, p. 547-53.
- Annabi, B., S. Rojas-Sutterlin, C. Laflamme, M. P. Lachambre, Y. Rolland, H. Sartelet et R. Beliveau, 2008. "Tumor environment dictates medulloblastoma cancer stem cell expression and invasive phenotype." *Mol Cancer Res*, vol. 6, 6, p. 907-16.
- Annabi, B., M. P. Lachambre, K. Plouffe, H. Sartelet et R. Beliveau, 2009. "Modulation of invasive properties of CD133+ glioblastoma stem cells: a role for MT1-MMP in bioactive lysophospholipid signaling." *Mol Carcinog*, vol. 48, 10, p. 910-9.
- Annabi, B., C. Laflamme, A. Sina, M. P. Lachambre et R. Beliveau, 2009. "A MT1-MMP/NF-kappaB signaling axis as a checkpoint controller of COX-2 expression in CD133+ U87 glioblastoma cells." *J Neuroinflammation*, vol. 6, p. 8.
- Aruffo, A., I. Stamenkovic, M. Melnick, C. B. Underhill et B. Seed, 1990. "CD44 is the principal cell surface receptor for hyaluronate." *Cell*, vol. 61, 7, p. 1303-13.
- Ashcroft, G. S., K. Lei, W. Jin, G. Longenecker, A. B. Kulkarni, T. Greenwell-Wild, H. Hale-Donze, G. McGrady, X. Y. Song et S. M. Wahl, 2000. "Secretory leukocyte

protease inhibitor mediates non-redundant functions necessary for normal wound healing." *Nat Med*, vol. 6, 10, p. 1147-53.

Baba, T., P. A. Convery, N. Matsumura, R. S. Whitaker, E. Kondoh, T. Perry, Z. Huang, R. C. Bentley, S. Mori, S. Fujii, J. R. Marks, A. Berchuck et S. K. Murphy, 2009. "Epigenetic regulation of CD133 and tumorigenicity of CD133+ ovarian cancer cells." *Oncogene*, vol. 28, 2, p. 209-18.

Bair, E. L., M. L. Chen, K. McDaniel, K. Sekiguchi, A. E. Cress, R. B. Nagle et G. T. Bowden, 2005. "Membrane type 1 matrix metalloprotease cleaves laminin-10 and promotes prostate cancer cell migration." *Neoplasia*, vol. 7, 4, p. 380-9.

Bao, S., Q. Wu, R. E. McLendon, Y. Hao, Q. Shi, A. B. Hjelmeland, M. W. Dewhirst, D. D. Bigner et J. N. Rich, 2006. "Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response." *Nature*, vol. 444, 7120, p. 756-60.

Belien, A. T., P. A. Paganetti et M. E. Schwab, 1999. "Membrane-type 1 matrix metalloprotease (MT1-MMP) enables invasive migration of glioma cells in central nervous system white matter." *J Cell Biol*, vol. 144, 2, p. 373-84.

Belkin, A. M., S. S. Akimov, L. S. Zaritskaya, B. I. Ratnikov, E. I. Deryugina et A. Y. Strongin, 2001. "Matrix-dependent proteolysis of surface transglutaminase by membrane-type metalloproteinase regulates cancer cell adhesion and locomotion." *J Biol Chem*, vol. 276, 21, p. 18415-22.

Bergers, G., R. Brekken, G. McMahon, T. H. Vu, T. Itoh, K. Tamaki, K. Tazawa, P. Thorpe, S. Itohara, Z. Werb et D. Hanahan, 2000. "Matrix metalloproteinase-9 triggers the angiogenic switch during carcinogenesis." *Nat Cell Biol*, vol. 2, 10, p. 737-44.

Bidlingmaier, S., X. Zhu et B. Liu, 2008. "The utility and limitations of glycosylated human CD133 epitopes in defining cancer stem cells." *J Mol Med*, vol. 86, 9, p. 1025-32.

Bigg, H. F., C. J. Morrison, G. S. Butler, M. A. Bogoyevitch, Z. Wang, P. D. Soloway et C. M. Overall, 2001. "Tissue inhibitor of metalloproteinases-4 inhibits but does not support the activation of gelatinase A via efficient inhibition of membrane type 1-matrix metalloproteinase." *Cancer Res*, vol. 61, 9, p. 3610-8.

Bode, W., P. Reinemer, R. Huber, T. Kleine, S. Schnierer et H. Tschesche, 1994. "The X-ray crystal structure of the catalytic domain of human neutrophil collagenase

inhibited by a substrate analogue reveals the essentials for catalysis and specificity." *Embo J*, vol. 13, 6, p. 1263-9.

Boivin, D., D. Labbe, N. Fontaine, S. Lamy, E. Beaulieu, D. Gingras et R. Beliveau, 2009. "The stem cell marker CD133 (prominin-1) is phosphorylated on cytoplasmic tyrosine-828 and tyrosine-852 by Src and Fyn tyrosine kinases." *Biochemistry*, vol. 48, 18, p. 3998-4007.

Bonnet, D. et J. E. Dick, 1997. "Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell." *Nat Med*, vol. 3, 7, p. 730-7.

Bravo-Cordero, J. J., R. Marrero-Diaz, D. Megias, L. Genis, A. Garcia-Grande, M. A. Garcia, A. G. Arroyo et M. C. Montoya, 2007. "MT1-MMP proinvasive activity is regulated by a novel Rab8-dependent exocytic pathway." *Embo J*, vol. 26, 6, p. 1499-510.

Brinckerhoff, C. E. et L. M. Matrisian, 2002. "Matrix metalloproteinases: a tail of a frog that became a prince." *Nat Rev Mol Cell Biol*, vol. 3, 3, p. 207-14.

Bruno, S., B. Bussolati, C. Grange, F. Collino, M. E. Graziano, U. Ferrando et G. Camussi, 2006. "CD133+ renal progenitor cells contribute to tumor angiogenesis." *Am J Pathol*, vol. 169, 6, p. 2223-35.

Calabrese, C., H. Poppleton, M. Kocak, T. L. Hogg, C. Fuller, B. Hamner, E. Y. Oh, M. W. Gaber, D. Finklestein, M. Allen, A. Frank, I. T. Bayazitov, S. S. Zakharenko, A. Gajjar, A. Davidoff et R. J. Gilbertson, 2007. "A perivascular niche for brain tumor stem cells." *Cancer Cell*, vol. 11, 1, p. 69-82.

Chang, C. et Z. Werb, 2001. "The many faces of metalloproteases: cell growth, invasion, angiogenesis and metastasis." *Trends Cell Biol*, vol. 11, 11, p. S37-43.

Chin, J. R., G. Murphy et Z. Werb, 1985. "Stromelysin, a connective tissue-degrading metalloendopeptidase secreted by stimulated rabbit synovial fibroblasts in parallel with collagenase. Biosynthesis, isolation, characterization, and substrates." *J Biol Chem*, vol. 260, 22, p. 12367-76.

Collins, A. T., P. A. Berry, C. Hyde, M. J. Stower et N. J. Maitland, 2005. "Prospective identification of tumorigenic prostate cancer stem cells." *Cancer Res*, vol. 65, 23, p. 10946-51.

Corbeil, D., K. Roper, A. Weigmann et W. B. Huttner, 1998. "AC133 hematopoietic stem cell antigen: human homologue of mouse kidney prominin or distinct member of a novel protein family?" *Blood*, vol. 91, 7, p. 2625-6.

Corbeil, D., K. Roper, M. J. Hannah, A. Hellwig et W. B. Huttner, 1999. "Selective localization of the polytopic membrane protein prominin in microvilli of epithelial cells - a combination of apical sorting and retention in plasma membrane protrusions." *J Cell Sci*, vol. 112 (Pt 7), p. 1023-33.

Corbeil, D., K. Roper, A. Hellwig, M. Tavian, S. Miraglia, S. M. Watt, P. J. Simmons, B. Peault, D. W. Buck et W. B. Huttner, 2000. "The human AC133 hematopoietic stem cell antigen is also expressed in epithelial cells and targeted to plasma membrane protrusions." *J Biol Chem*, vol. 275, 8, p. 5512-20.

Corbeil, D., K. Roper, C. A. Fargeas, A. Joester et W. B. Huttner, 2001. "Prominin: a story of cholesterol, plasma membrane protrusions and human pathology." *Traffic*, vol. 2, 2, p. 82-91.

Corbeil, D., A. Joester, C. A. Fargeas, J. Jaszai, J. Garwood, A. Hellwig, H. B. Werner et W. B. Huttner, 2009. "Expression of distinct splice variants of the stem cell marker prominin-1 (CD133) in glial cells." *Glia*, vol. 57, 8, p. 860-74.

d'Ortho, M. P., H. Will, S. Atkinson, G. Butler, A. Messent, J. Gavrilovic, B. Smith, R. Timpl, L. Zardi et G. Murphy, 1997. "Membrane-type matrix metalloproteinases 1 and 2 exhibit broad-spectrum proteolytic capacities comparable to many matrix metalloproteinases." *Eur J Biochem*, vol. 250, 3, p. 751-7.

Dalerba, P., S. J. Dylla, I. K. Park, R. Liu, X. Wang, R. W. Cho, T. Hoey, A. Gurney, E. H. Huang, D. M. Simeone, A. A. Shelton, G. Parmiani, C. Castelli et M. F. Clarke, 2007. "Phenotypic characterization of human colorectal cancer stem cells." *Proc Natl Acad Sci USA*, vol. 104, 24, p. 10158-63.

Dean, M., T. Fojo et S. Bates, 2005. "Tumour stem cells and drug resistance." *Nat Rev Cancer*, vol. 5, 4, p. 275-84.

Dean, M., 2006. "Cancer stem cells: redefining the paradigm of cancer treatment strategies." *Mol Interv*, vol. 6, 3, p. 140-8.

Deschamps, A. M., J. Zavadzkas, R. L. Murphy, C. N. Koval, J. E. McLean, L. Jeffords, S. M. Saunders, N. J. Sheats, R. E. Stroud et F. G. Spinale, 2008. "Interruption of endothelin signaling modifies membrane type 1 matrix metalloproteinase activity during ischemia and reperfusion." *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, vol. 294, 2, p. H875-83.

Ding, X. W., J. H. Wu et C. P. Jiang, 2010. "ABCG2: a potential marker of stem cells and novel target in stem cell and cancer therapy." *Life Sci*, vol. 86, 17-18, p. 631-7.

Dittfeld, C., A. Dietrich, S. Peickert, S. Hering, M. Baumann, M. Grade, T. Ried et L. A. Kunz-Schughart, 2009. "CD133 expression is not selective for tumor-initiating or radioresistant cell populations in the CRC cell lines HCT-116." *Radiother Oncol*, vol. 92, 3, p. 353-61.

Docherty, A. J. et G. Murphy, 1990. "The tissue metalloproteinase family and the inhibitor TIMP: a study using cDNAs and recombinant proteins." *Ann Rheum Dis*, vol. 49 Suppl 1, p. 469-79.

Doyle, L. A., W. Yang, L. V. Abruzzo, T. Krogmann, Y. Gao, A. K. Rishi et D. D. Ross, 1998. "A multidrug resistance transporter from human MCF-7 breast cancer cells." *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 95, 26, p. 15665-70.

Endo, K., T. Takino, H. Miyamori, H. Kinsen, T. Yoshizaki, M. Furukawa et H. Sato, 2003. "Cleavage of syndecan-1 by membrane type matrix metalloproteinase-1 stimulates cell migration." *J Biol Chem*, vol. 278, 42, p. 40764-70.

English, W. R., X. S. Puente, J. M. Freije, V. Knauper, A. Amour, A. Merryweather, C. Lopez-Otin et G. Murphy, 2000. "Membrane type 4 matrix metalloproteinase (MMP17) has tumor necrosis factor-alpha convertase activity but does not activate pro-MMP2." *J Biol Chem*, vol. 275, 19, p. 14046-55.

Eramo, A., F. Lotti, G. Sette, E. Pillozzi, M. Biffoni, A. Di Virgilio, C. Conticello, L. Ruco, C. Peschle et R. De Maria, 2008. "Identification and expansion of the tumorigenic lung cancer stem cell population." *Cell Death Differ*, vol. 15, 3, p. 504-14.

Fargeas, C. A., M. Florek, W. B. Huttner et D. Corbeil, 2003. "Characterization of prominin-2, a new member of the prominin family of pentaspan membrane glycoproteins." *J Biol Chem*, vol. 278, 10, p. 8586-96.

Fargeas, C. A., A. Joester, E. Missol-Kolka, A. Hellwig, W. B. Huttner et D. Corbeil, 2004. "Identification of novel Prominin-1/CD133 splice variants with alternative C-termini and their expression in epididymis and testis." *J Cell Sci*, vol. 117, Pt 18, p. 4301-11.

Fargeas, C. A., W. B. Huttner et D. Corbeil, 2007. "Nomenclature of prominin-1 (CD133) splice variants - an update." *Tissue Antigens*, vol. 69, 6, p. 602-6.

- Ferrandina, G., G. Bonanno, L. Pierelli, A. Perillo, A. Procoli, A. Mariotti, M. Corallo, E. Martinelli, S. Rutella, A. Paglia, G. Zannoni, S. Mancuso et G. Scambia, 2008. "Expression of CD133-1 and CD133-2 in ovarian cancer." *Int J Gynecol Cancer*, vol. 18, 3, p. 506-14.
- Florek, M., M. Haase, A. M. Marzesco, D. Freund, G. Ehninger, W. B. Huttner et D. Corbeil, 2005. "Prominin-1/CD133, a neural and hematopoietic stem cell marker, is expressed in adult human differentiated cells and certain types of kidney cancer." *Cell Tissue Res*, vol. 319, 1, p. 15-26.
- Galvez, B. G., S. Matias-Roman, M. Yanez-Mo, F. Sanchez-Madrid et A. G. Arroyo, 2002. "ECM regulates MT1-MMP localization with beta1 or alpha5beta3 integrins at distinct cell compartments modulating its internalization and activity on human endothelial cells." *J Cell Biol*, vol. 159, 3, p. 509-21.
- Gibbs, C. P., V. G. Kukekov, J. D. Reith, O. Tchigrinova, O. N. Suslov, E. W. Scott, S. C. Ghivizzani, T. N. Ignatova et D. A. Steindler, 2005. "Stem-like cells in bone sarcomas: implications for tumorigenesis." *Neoplasia*, vol. 7, 11, p. 967-76.
- Giebel, B., D. Corbeil, J. Beckmann, J. Hohn, D. Freund, K. Giesen, J. Fischer, G. Kogler et P. Wernet, 2004. "Segregation of lipid raft markers including CD133 in polarized human hematopoietic stem and progenitor cells." *Blood*, vol. 104, 8, p. 2332-8.
- Gingras, D., N. Bousquet-Gagnon, S. Langlois, M. P. Lachambre, B. Annabi et R. Beliveau, 2001. "Activation of the extracellular signal-regulated protein kinase (ERK) cascade by membrane-type-1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP)." *FEBS Lett*, vol. 507, 2, p. 231-6.
- Gingras, D. et R. Beliveau, 2010. "Emerging concepts in the regulation of membrane-type 1 matrix metalloproteinase activity." *Biochim Biophys Acta*, vol. 1803, 1, p. 142-50.
- Goodell, M. A., K. Brose, G. Paradis, A. S. Conner et R. C. Mulligan, 1996. "Isolation and functional properties of murine hematopoietic stem cells that are replicating in vivo." *J Exp Med*, vol. 183, 4, p. 1797-806.
- Gross, J. et C. M. Lapiere, 1962. "Collagenolytic activity in amphibian tissues: a tissue culture assay." *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 48, p. 1014-22.
- Guo, Y., M. Follo, K. Geiger, M. Lubbert et M. Engelhardt, 2003. "Side-population cells from different precursor compartments." *J Hematother Stem Cell Res*, vol. 12, 1, p. 71-82.

Hanahan, D. et R. A. Weinberg, 2000. "The hallmarks of cancer." *Cell*, vol. 100, 1, p. 57-70.

Hiraoka, N., E. Allen, I. J. Apel, M. R. Gyetko et S. J. Weiss, 1998. "Matrix metalloproteinases regulate neovascularization by acting as pericellular fibrinolysins." *Cell*, vol. 95, 3, p. 365-77.

Hofmann, U. B., J. R. Westphal, G. N. Van Muijen et D. J. Ruiter, 2000. "Matrix metalloproteinases in human melanoma." *J Invest Dermatol*, vol. 115, 3, p. 337-44.

Holmbeck, K., P. Bianco, J. Caterina, S. Yamada, M. Kromer, S. A. Kuznetsov, M. Mankani, P. G. Robey, A. R. Poole, I. Pidoux, J. M. Ward et H. Birkedal-Hansen, 1999. "MT1-MMP-deficient mice develop dwarfism, osteopenia, arthritis, and connective tissue disease due to inadequate collagen turnover." *Cell*, vol. 99, 1, p. 81-92.

Hope, K. J., L. Jin et J. E. Dick, 2004. "Acute myeloid leukemia originates from a hierarchy of leukemic stem cell classes that differ in self-renewal capacity." *Nat Immunol*, vol. 5, 7, p. 738-43.

Hotary, K., E. Allen, A. Punturieri, I. Yana et S. J. Weiss, 2000. "Regulation of cell invasion and morphogenesis in a three-dimensional type I collagen matrix by membrane-type matrix metalloproteinases 1, 2, and 3." *J Cell Biol*, vol. 149, 6, p. 1309-23.

Hotary, K., X. Y. Li, E. Allen, S. L. Stevens et S. J. Weiss, 2006. "A cancer cell metalloprotease triad regulates the basement membrane transmigration program." *Genes Dev*, vol. 20, 19, p. 2673-86.

Iida, J., K. L. Wilhelmson, M. A. Price, C. M. Wilson, D. Pei, L. T. Furcht et J. B. McCarthy, 2004. "Membrane type-1 matrix metalloproteinase promotes human melanoma invasion and growth." *J Invest Dermatol*, vol. 122, 1, p. 167-76.

Itoh, Y., M. Kajita, H. Kinoh, H. Mori, A. Okada et M. Seiki, 1999. "Membrane type 4 matrix metalloproteinase (MT4-MMP, MMP-17) is a glycosylphosphatidylinositol-anchored proteinase." *J Biol Chem*, vol. 274, 48, p. 34260-6.

Itoh, Y., A. Takamura, N. Ito, Y. Maru, H. Sato, N. Suenaga, T. Aoki et M. Seiki, 2001. "Homophilic complex formation of MT1-MMP facilitates proMMP-2 activation on the cell surface and promotes tumor cell invasion." *Embo J*, vol. 20, 17, p. 4782-93.

- Itoh, Y. et M. Seiki, 2006. "MT1-MMP: a potent modifier of pericellular microenvironment." *J Cell Physiol*, vol. 206, 1, p. 1-8.
- Jemal, A., R. Siegel, E. Ward, Y. Hao, J. Xu et M. J. Thun, 2009. "Cancer statistics, 2009." *CA Cancer J Clin*, vol. 59, 4, p. 225-49.
- Jiang, A., K. Lehti, X. Wang, S. J. Weiss, J. Keski-Oja et D. Pei, 2001. "Regulation of membrane-type matrix metalloproteinase 1 activity by dynamin-mediated endocytosis." *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 98, 24, p. 13693-8.
- Jordan, C. T., M. L. Guzman et M. Noble, 2006. "Cancer stem cells." *N Engl J Med*, vol. 355, 12, p. 1253-61.
- Kajita, M., Y. Itoh, T. Chiba, H. Mori, A. Okada, H. Kinoh et M. Seiki, 2001. "Membrane-type 1 matrix metalloproteinase cleaves CD44 and promotes cell migration." *J Cell Biol*, vol. 153, 5, p. 893-904.
- Kemper, K., M. R. Sprick, M. de Bree, A. Scopelliti, L. Vermeulen, M. Hoek, J. Zeilstra, S. T. Pals, H. Mehmet, G. Stassi et J. P. Medema, 2010. "The AC133 epitope, but not the CD133 protein, is lost upon cancer stem cell differentiation." *Cancer Res*, vol. 70, 2, p. 719-29.
- Kim, C. F., E. L. Jackson, A. E. Woolfenden, S. Lawrence, I. Babar, S. Vogel, D. Crowley, R. T. Bronson et T. Jacks, 2005. "Identification of bronchioalveolar stem cells in normal lung and lung cancer." *Cell*, vol. 121, 6, p. 823-35.
- Kim, M., H. Turnquist, J. Jackson, M. Sgagias, Y. Yan, M. Gong, M. Dean, J. G. Sharp et K. Cowan, 2002. "The multidrug resistance transporter ABCG2 (breast cancer resistance protein 1) effluxes Hoechst 33342 and is overexpressed in hematopoietic stem cells." *Clin Cancer Res*, vol. 8, 1, p. 22-8.
- Klein, W. M., B. P. Wu, S. Zhao, H. Wu, A. J. Klein-Szanto et S. R. Tahan, 2007. "Increased expression of stem cell markers in malignant melanoma." *Mod Pathol*, vol. 20, 1, p. 102-7.
- Knauper, V., H. Will, C. Lopez-Otin, B. Smith, S. J. Atkinson, H. Stanton, R. M. Hembray et G. Murphy, 1996. "Cellular mechanisms for human procollagenase-3 (MMP-13) activation. Evidence that MT1-MMP (MMP-14) and gelatinase a (MMP-2) are able to generate active enzyme." *J Biol Chem*, vol. 271, 29, p. 17124-31.
- Koike, T., R. B. Vernon, M. A. Hamner, E. Sadoun et M. J. Reed, 2002. "MT1-MMP, but not secreted MMPs, influences the migration of human microvascular endothelial cells in 3-dimensional collagen gels." *J Cell Biochem*, vol. 86, 4, p. 748-58.

Kojima, S., Y. Itoh, S. Matsumoto, Y. Masuho et M. Seiki, 2000. "Membrane-type 6 matrix metalloproteinase (MT6-MMP, MMP-25) is the second glycosyl-phosphatidyl inositol (GPI)-anchored MMP." *FEBS Lett*, vol. 480, 2-3, p. 142-6.

Koshikawa, N., G. Giannelli, V. Cirulli, K. Miyazaki et V. Quaranta, 2000. "Role of cell surface metalloprotease MT1-MMP in epithelial cell migration over laminin-5." *J Cell Biol*, vol. 148, 3, p. 615-24.

Kreiger, N., F. D. Ashbury, M. P. Purdue et L. D. Marrett, 2003. "Workshop report: environmental exposures and cancer prevention." *Environ Health Perspect*, vol. 111, 1, p. 105-8.

Kridel, S. J., H. Sawai, B. I. Ratnikov, E. I. Chen, W. Li, A. Godzik, A. Y. Strongin et J. W. Smith, 2002. "A unique substrate binding mode discriminates membrane type-1 matrix metalloproteinase from other matrix metalloproteinases." *J Biol Chem*, vol. 277, 26, p. 23788-93.

Labrecque, L., C. Nyalendo, S. Langlois, Y. Durocher, C. Roghi, G. Murphy, D. Gingras et R. Beliveau, 2004. "Src-mediated tyrosine phosphorylation of caveolin-1 induces its association with membrane type 1 matrix metalloproteinase." *J Biol Chem*, vol. 279, 50, p. 52132-40.

Langlois, S., D. Gingras et R. Beliveau, 2004. "Membrane type 1-matrix metalloproteinase (MT1-MMP) cooperates with sphingosine 1-phosphate to induce endothelial cell migration and morphogenic differentiation." *Blood*, vol. 103, 8, p. 3020-8.

Lapidot, T., C. Sirard, J. Vormoor, B. Murdoch, T. Hoang, J. Caceres-Cortes, M. Minden, B. Paterson, M. A. Caligiuri et J. E. Dick, 1994. "A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice." *Nature*, vol. 367, 6464, p. 645-8.

Lehti, K., H. Valtanen, S. A. Wickstrom, J. Lohi et J. Keski-Oja, 2000. "Regulation of membrane-type-1 matrix metalloproteinase activity by its cytoplasmic domain." *J Biol Chem*, vol. 275, 20, p. 15006-13.

Lehti, K., J. Lohi, M. M. Juntunen, D. Pei et J. Keski-Oja, 2002. "Oligomerization through hemopexin and cytoplasmic domains regulates the activity and turnover of membrane-type 1 matrix metalloproteinase." *J Biol Chem*, vol. 277, 10, p. 8440-8.

- Li, C., D. G. Heidt, P. Dalerba, C. F. Burant, L. Zhang, V. Adsay, M. Wicha, M. F. Clarke et D. M. Simeone, 2007. "Identification of pancreatic cancer stem cells." *Cancer Res*, vol. 67, 3, p. 1030-7.
- Li, Y., T. Aoki, Y. Mori, M. Ahmad, H. Miyamori, T. Takino et H. Sato, 2004. "Cleavage of lumican by membrane-type matrix metalloproteinase-1 abrogates this proteoglycan-mediated suppression of tumor cell colony formation in soft agar." *Cancer Res*, vol. 64, 19, p. 7058-64.
- Liu, G., X. Yuan, Z. Zeng, P. Tunici, H. Ng, I. R. Abdulkadir, L. Lu, D. Irvin, K. L. Black et J. S. Yu, 2006. "Analysis of gene expression and chemoresistance of CD133+ cancer stem cells in glioblastoma." *Mol Cancer*, vol. 5, p. 67.
- Lu, C., X. Y. Li, Y. Hu, R. G. Rowe et S. J. Weiss, 2010. "MT1-MMP controls human mesenchymal stem cell trafficking and differentiation." *Blood*, vol. 115, 2, p. 221-9.
- Ludwig, T., S. M. Theissen, M. J. Morton et M. J. Caplan, 2008. "The cytoplasmic tail dileucine motif LL572 determines the glycosylation pattern of membrane-type 1 matrix metalloproteinase." *J Biol Chem*, vol. 283, 51, p. 35410-8.
- Maw, M. A., D. Corbeil, J. Koch, A. Hellwig, J. C. Wilson-Wheeler, R. J. Bridges, G. Kumaramanickavel, S. John, D. Nancarrow, K. Roper, A. Weigmann, W. B. Huttner et M. J. Denton, 2000. "A frameshift mutation in prominin (mouse)-like 1 causes human retinal degeneration." *Hum Mol Genet*, vol. 9, 1, p. 27-34.
- Mazzone, M., M. Baldassarre, G. Beznoussenko, G. Giacchetti, J. Cao, S. Zucker, A. Luini et R. Buccione, 2004. "Intracellular processing and activation of membrane type 1 matrix metalloprotease depends on its partitioning into lipid domains." *J Cell Sci*, vol. 117, Pt 26, p. 6275-87.
- Melnick, R. L., J. Huff, J. C. Barrett, R. R. Maronpot, G. Lucier et C. J. Portier, 1993. "Cell proliferation and chemical carcinogenesis: a symposium overview." *Mol Carcinog*, vol. 7, 3, p. 135-8.
- Miraglia, S., W. Godfrey, A. H. Yin, K. Atkins, R. Warnke, J. T. Holden, R. A. Bray, E. K. Waller et D. W. Buck, 1997. "A novel five-transmembrane hematopoietic stem cell antigen: isolation, characterization, and molecular cloning." *Blood*, vol. 90, 12, p. 5013-21.
- Miraglia, S., W. Godfrey et D. Buck, 1998. "A response to AC133 hematopoietic stem cell antigen: human homologue of mouse kidney prominin or distinct member of a novel protein family?" *Blood*, vol. 91, 11, p. 4390-1.

Monzani, E., F. Facchetti, E. Galmozzi, E. Corsini, A. Benetti, C. Cavazzin, A. Gritti, A. Piccinini, D. Porro, M. Santinami, G. Invernici, E. Parati, G. Alessandri et C. A. La Porta, 2007. "Melanoma contains CD133 and ABCG2 positive cells with enhanced tumourigenic potential." *Eur J Cancer*, vol. 43, 5, p. 935-46.

Mori, H., T. Tomari, N. Koshikawa, M. Kajita, Y. Itoh, H. Sato, H. Tojo, I. Yana et M. Seiki, 2002. "CD44 directs membrane-type 1 matrix metalloproteinase to lamellipodia by associating with its hemopexin-like domain." *Embo J*, vol. 21, 15, p. 3949-59.

Moss, N. M., Y. I. Wu, Y. Liu, H. G. Munshi et M. S. Stack, 2009. "Modulation of the membrane type 1 matrix metalloproteinase cytoplasmic tail enhances tumor cell invasion and proliferation in three-dimensional collagen matrices." *J Biol Chem*, vol. 284, 30, p. 19791-9.

Murphy, G. et V. Knauper, 1997. "Relating matrix metalloproteinase structure to function: why the "hemopexin" domain?" *Matrix Biol*, vol. 15, 8-9, p. 511-8.

Murphy, G. et J. Gavrilovic, 1999. "Proteolysis and cell migration: creating a path?" *Curr Opin Cell Biol*, vol. 11, 5, p. 614-21.

Murphy, G. et H. Nagase, 2008. "Progress in matrix metalloproteinase research." *Mol Aspects Med*, vol. 29, 5, p. 290-308.

Nagase, H., A. J. Barrett et J. F. Woessner, Jr., 1992. "Nomenclature and glossary of the matrix metalloproteinases." *Matrix Suppl*, vol. 1, p. 421-4.

Nagase, H., R. Visse et G. Murphy, 2006. "Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs." *Cardiovasc Res*, vol. 69, 3, p. 562-73.

Nakada, M., H. Nakamura, E. Ikeda, N. Fujimoto, J. Yamashita, H. Sato, M. Seiki et Y. Okada, 1999. "Expression and tissue localization of membrane-type 1, 2, and 3 matrix metalloproteinases in human astrocytic tumors." *Am J Pathol*, vol. 154, 2, p. 417-28.

Nakada, M., A. Yamada, T. Takino, H. Miyamori, T. Takahashi, J. Yamashita et H. Sato, 2001. "Suppression of membrane-type 1 matrix metalloproteinase (MMP)-mediated MMP-2 activation and tumor invasion by testican 3 and its splicing variant gene product, N-Tes." *Cancer Res*, vol. 61, 24, p. 8896-902.

Nakahara, H., L. Howard, E. W. Thompson, H. Sato, M. Seiki, Y. Yeh et W. T. Chen, 1997. "Transmembrane/cytoplasmic domain-mediated membrane type 1-matrix

metalloprotease docking to invadopodia is required for cell invasion." *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 94, 15, p. 7959-64.

Nakamura, H., N. Suenaga, K. Taniwaki, H. Matsuki, K. Yonezawa, M. Fujii, Y. Okada et M. Seiki, 2004. "Constitutive and induced CD44 shedding by ADAM-like proteases and membrane-type 1 matrix metalloproteinase." *Cancer Res*, vol. 64, 3, p. 876-82.

Navarro-Alvarez, N., E. Kondo, H. Kawamoto, W. Hassan, T. Yuasa, Y. Kubota, M. Seita, H. Nakahara, T. Hayashi, Y. Nishikawa, R. A. Hassan, S. M. Javed, H. Noguchi, S. Matsumoto, S. Nakaji, N. Tanaka, N. Kobayashi et A. Soto-Gutierrez, 2010. "Isolation and Propagation of a Human CD133-Negative Colon Tumor Derived Cell Line with Tumorigenic and Angiogenic Properties." *Cell Transplant*, p.

Nyalendo, C., M. Michaud, E. Beaulieu, C. Roghi, G. Murphy, D. Gingras et R. Beliveau, 2007. "Src-dependent phosphorylation of membrane type I matrix metalloproteinase on cytoplasmic tyrosine 573: role in endothelial and tumor cell migration." *J Biol Chem*, vol. 282, 21, p. 15690-9.

Nyalendo, C., E. Beaulieu, H. Sartelet, M. Michaud, N. Fontaine, D. Gingras et R. Beliveau, 2008. "Impaired tyrosine phosphorylation of membrane type 1-matrix metalloproteinase reduces tumor cell proliferation in three-dimensional matrices and abrogates tumor growth in mice." *Carcinogenesis*, vol. 29, 8, p. 1655-64.

Nyalendo, C., H. Sartelet, S. Barrette, S. Ohta, D. Gingras et R. Beliveau, 2009. "Identification of membrane-type 1 matrix metalloproteinase tyrosine phosphorylation in association with neuroblastoma progression." *BMC Cancer*, vol. 9, p. 422.

Nyalendo, C., H. Sartelet, D. Gingras et R. Beliveau, 2010. "Inhibition of membrane-type 1 matrix metalloproteinase tyrosine phosphorylation blocks tumor progression in mice." *Anticancer Res*, vol. 30, 6, p. 1887-95.

O'Brien, C. A., A. Pollett, S. Gallinger et J. E. Dick, 2007. "A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice." *Nature*, vol. 445, 7123, p. 106-10.

Ohkubo, S., K. Miyadera, Y. Sugimoto, K. Matsuo, K. Wierzbicka et Y. Yamada, 1999. "Identification of substrate sequences for membrane type-1 matrix metalloproteinase using bacteriophage peptide display library." *Biochem Biophys Res Commun*, vol. 266, 2, p. 308-13.

Ohtaki, T., Y. Shintani, S. Honda, H. Matsumoto, A. Hori, K. Kanehashi, Y. Terao, S. Kumano, Y. Takatsu, Y. Masuda, Y. Ishibashi, T. Watanabe, M. Asada, T. Yamada, M. Suenaga, C. Kitada, S. Usuki, T. Kurokawa, H. Onda, O. Nishimura et M. Fujino, 2001. "Metastasis suppressor gene KiSS-1 encodes peptide ligand of a G-protein-coupled receptor." *Nature*, vol. 411, 6837, p. 613-7.

Ohuchi, E., K. Imai, Y. Fujii, H. Sato, M. Seiki et Y. Okada, 1997. "Membrane type 1 matrix metalloproteinase digests interstitial collagens and other extracellular matrix macromolecules." *J Biol Chem*, vol. 272, 4, p. 2446-51.

Okada, A., J. P. Bellocq, N. Rouyer, M. P. Chenard, M. C. Rio, P. Chambon et P. Basset, 1995. "Membrane-type matrix metalloproteinase (MT-MMP) gene is expressed in stromal cells of human colon, breast, and head and neck carcinomas." *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 92, 7, p. 2730-4.

Olsen, J. V., B. Blagoev, F. Gnad, B. Macek, C. Kumar, P. Mortensen et M. Mann, 2006. "Global, in vivo, and site-specific phosphorylation dynamics in signaling networks." *Cell*, vol. 127, 3, p. 635-48.

Olson, T. S. et K. Ley, 2002. "Chemokines and chemokine receptors in leukocyte trafficking." *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, vol. 283, 1, p. R7-28.

Ouyang, M., S. Lu, X. Y. Li, J. Xu, J. Seong, B. N. Giepmans, J. Y. Shyy, S. J. Weiss et Y. Wang, 2008. "Visualization of polarized membrane type 1 matrix metalloproteinase activity in live cells by fluorescence resonance energy transfer imaging." *J Biol Chem*, vol. 283, 25, p. 17740-8.

Page-McCaw, A., A. J. Ewald et Z. Werb, 2007. "Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling." *Nat Rev Mol Cell Biol*, vol. 8, 3, p. 221-33.

Parks, C. W. et P. R. Mechem. 1998. *Matrix Metalloproteinases*. San Diego: Academic Press, 362 p.

Patrawala, L., T. Calhoun, R. Schneider-Broussard, H. Li, B. Bhatia, S. Tang, J. G. Reilly, D. Chandra, J. Zhou, K. Claypool, L. Coghlan et D. G. Tang, 2006. "Highly purified CD44+ prostate cancer cells from xenograft human tumors are enriched in tumorigenic and metastatic progenitor cells." *Oncogene*, vol. 25, 12, p. 1696-708.

Prince, M. E., R. Sivanandan, A. Kaczorowski, G. T. Wolf, M. J. Kaplan, P. Dalerba, I. L. Weissman, M. F. Clarke et L. E. Ailles, 2007. "Identification of a subpopulation of cells with cancer stem cell properties in head and neck squamous cell carcinoma." *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 104, 3, p. 973-8.

Puyraimond, A., R. Fridman, M. Lemesle, B. Arbeille et S. Menashi, 2001. "MMP-2 colocalizes with caveolae on the surface of endothelial cells." *Exp Cell Res*, vol. 262, 1, p. 28-36.

Ranganathan, R. et E. M. Ross, 1997. "PDZ domain proteins: scaffolds for signaling complexes." *Curr Biol*, vol. 7, 12, p. R770-3.

Rappa, G., O. Fodstad et A. Lorico, 2008. "The stem cell-associated antigen CD133 (Prominin-1) is a molecular therapeutic target for metastatic melanoma." *Stem Cells*, vol. 26, 12, p. 3008-17.

Ratnikov, B. I., D. V. Rozanov, T. I. Postnova, P. G. Baci, H. Zhang, R. G. DiScipio, G. G. Chestukhina, J. W. Smith, E. I. Deryugina et A. Y. Strongin, 2002. "An alternative processing of integrin $\alpha(v)$ subunit in tumor cells by membrane type-1 matrix metalloproteinase." *J Biol Chem*, vol. 277, 9, p. 7377-85.

Remacle, A., G. Murphy et C. Roghi, 2003. "Membrane type I-matrix metalloproteinase (MT1-MMP) is internalised by two different pathways and is recycled to the cell surface." *J Cell Sci*, vol. 116, Pt 19, p. 3905-16.

Remacle, A. G., D. V. Rozanov, M. Fugere, R. Day et A. Y. Strongin, 2006. "Furin regulates the intracellular activation and the uptake rate of cell surface-associated MT1-MMP." *Oncogene*, vol. 25, 41, p. 5648-55.

Reya, T., S. J. Morrison, M. F. Clarke et I. L. Weissman, 2001. "Stem cells, cancer, and cancer stem cells." *Nature*, vol. 414, 6859, p. 105-11.

Richardson, G. D., C. N. Robson, S. H. Lang, D. E. Neal, N. J. Maitland et A. T. Collins, 2004. "CD133, a novel marker for human prostatic epithelial stem cells." *J Cell Sci*, vol. 117, Pt 16, p. 3539-45.

Ries, C., V. Egea, M. Karow, H. Kolb, M. Jochum et P. Neth, 2007. "MMP-2, MT1-MMP, and TIMP-2 are essential for the invasive capacity of human mesenchymal stem cells: differential regulation by inflammatory cytokines." *Blood*, vol. 109, 9, p. 4055-63.

Roper, K., D. Corbeil et W. B. Huttner, 2000. "Retention of prominin in microvilli reveals distinct cholesterol-based lipid micro-domains in the apical plasma membrane." *Nat Cell Biol*, vol. 2, 9, p. 582-92.

Rozanov, D. V., E. I. Deryugina, B. I. Ratnikov, E. Z. Monosov, G. N. Marchenko, J. P. Quigley et A. Y. Strongin, 2001. "Mutation analysis of membrane type-1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP). The role of the cytoplasmic tail Cys(574), the active

site Glu(240), and furin cleavage motifs in oligomerization, processing, and self-proteolysis of MT1-MMP expressed in breast carcinoma cells." *J Biol Chem*, vol. 276, 28, p. 25705-14.

Rozanov, D. V., E. I. Deryugina, E. Z. Monosov, N. D. Marchenko et A. Y. Strongin, 2004. "Aberrant, persistent inclusion into lipid rafts limits the tumorigenic function of membrane type-1 matrix metalloproteinase in malignant cells." *Exp Cell Res*, vol. 293, 1, p. 81-95.

Sabeh, F., I. Ota, K. Holmbeck, H. Birkedal-Hansen, P. Soloway, M. Balbin, C. Lopez-Otin, S. Shapiro, M. Inada, S. Krane, E. Allen, D. Chung et S. J. Weiss, 2004. "Tumor cell traffic through the extracellular matrix is controlled by the membrane-anchored collagenase MT1-MMP." *J Cell Biol*, vol. 167, 4, p. 769-81.

Salmaggi, A., A. Boiardi, M. Gelati, A. Russo, C. Calatuzzolo, E. Ciusani, F. L. Sciacca, A. Ottolina, E. A. Parati, C. La Porta, G. Alessandri, C. Marras, D. Croci et M. De Rossi, 2006. "Glioblastoma-derived tumorspheres identify a population of tumor stem-like cells with angiogenic potential and enhanced multidrug resistance phenotype." *Glia*, vol. 54, 8, p. 850-60.

Sato, H., T. Takino, Y. Okada, J. Cao, A. Shinagawa, E. Yamamoto et M. Seiki, 1994. "A matrix metalloproteinase expressed on the surface of invasive tumour cells." *Nature*, vol. 370, 6484, p. 61-5.

Sato, H., T. Takino et H. Miyamori, 2005. "Roles of membrane-type matrix metalloproteinase-1 in tumor invasion and metastasis." *Cancer Sci*, vol. 96, 4, p. 212-7.

Sato, T., M. del Carmen Ovejero, P. Hou, A. M. Heegaard, M. Kumegawa, N. T. Foged et J. M. Delaisse, 1997. "Identification of the membrane-type matrix metalloproteinase MT1-MMP in osteoclasts." *J Cell Sci*, vol. 110 (Pt 5), p. 589-96.

Scadden, D. T., 2006. "The stem-cell niche as an entity of action." *Nature*, vol. 441, 7097, p. 1075-9.

Scharenberg, C. W., M. A. Harkey et B. Torok-Storb, 2002. "The ABCG2 transporter is an efficient Hoechst 33342 efflux pump and is preferentially expressed by immature human hematopoietic progenitors." *Blood*, vol. 99, 2, p. 507-12.

Schatton, T., N. Y. Frank et M. H. Frank, 2009. "Identification and targeting of cancer stem cells." *Bioessays*, vol. 31, 10, p. 1038-49.

- Seiki, M., H. Mori, M. Kajita, T. Uekita et Y. Itoh, 2003. "Membrane-type 1 matrix metalloproteinase and cell migration." *Biochem Soc Symp*, 70, p. 253-62.
- Sgambato, A., M. A. Puglisi, F. Errico, F. Rafanelli, A. Boninsegna, A. Rettino, G. Genovese, C. Coco, A. Gasbarrini et A. Cittadini, 2010. "Post-translational modulation of CD133 expression during sodium butyrate-induced differentiation of HT29 human colon cancer cells: implications for its detection." *J Cell Physiol*, vol. 224, 1, p. 234-41.
- Shirvaikar, N., L. A. Marquez-Curtis, A. R. Shaw, A. R. Turner et A. Janowska-Wieczorek, 2010. "MT1-MMP association with membrane lipid rafts facilitates G-CSF-induced hematopoietic stem/progenitor cell mobilization." *Exp Hematol*, vol. 38, 9, p. 823-835.
- Shmelkov, S. V., L. Jun, R. St Clair, D. McGarrigle, C. A. Derderian, J. K. Usenko, C. Costa, F. Zhang, X. Guo et S. Rafii, 2004. "Alternative promoters regulate transcription of the gene that encodes stem cell surface protein AC133." *Blood*, vol. 103, 6, p. 2055-61.
- Singh, S. K., C. Hawkins, I. D. Clarke, J. A. Squire, J. Bayani, T. Hide, R. M. Henkelman, M. D. Cusimano et P. B. Dirks, 2004. "Identification of human brain tumour initiating cells." *Nature*, vol. 432, 7015, p. 396-401.
- Sonnino, S., L. Mauri, V. Chigorno et A. Prinetti, 2007. "Gangliosides as components of lipid membrane domains." *Glycobiology*, vol. 17, 1, p. 1R-13R.
- Steffen, A., G. Le Dez, R. Poincloux, C. Recchi, P. Nassoy, K. Rottner, T. Galli et P. Chavrier, 2008. "MT1-MMP-dependent invasion is regulated by TI-VAMP/VAMP7." *Curr Biol*, vol. 18, 12, p. 926-31.
- Stricker, N. L., K. S. Christopherson, B. A. Yi, P. J. Schatz, R. W. Raab, G. Dawes, D. E. Bassett, Jr., D. S. Bredt et M. Li, 1997. "PDZ domain of neuronal nitric oxide synthase recognizes novel C-terminal peptide sequences." *Nat Biotechnol*, vol. 15, 4, p. 336-42.
- Strongin, A. Y., I. Collier, G. Bannikov, B. L. Marmer, G. A. Grant et G. I. Goldberg, 1995. "Mechanism of cell surface activation of 72-kDa type IV collagenase. Isolation of the activated form of the membrane metalloprotease." *J Biol Chem*, vol. 270, 10, p. 5331-8.
- Strongin, A. Y., 2009. "Proteolytic and non-proteolytic roles of membrane type-1 matrix metalloproteinase in malignancy." *Biochim Biophys Acta*, vol. 1803, 1, p. 133-41.

- Suetsugu, A., M. Nagaki, H. Aoki, T. Motohashi, T. Kunisada et H. Moriwaki, 2006. "Characterization of CD133+ hepatocellular carcinoma cells as cancer stem/progenitor cells." *Biochem Biophys Res Commun*, vol. 351, 4, p. 820-4.
- Sverdlov, M., A. N. Shajahan et R. D. Minshall, 2007. "Tyrosine phosphorylation-dependence of caveolae-mediated endocytosis." *J Cell Mol Med*, vol. 11, 6, p. 1239-50.
- Taieb, N., M. Maresca, X. J. Guo, N. Garmy, J. Fantini et N. Yahi, 2009. "The first extracellular domain of the tumour stem cell marker CD133 contains an antigenic ganglioside-binding motif." *Cancer Lett*, vol. 278, 2, p. 164-73.
- Takino, T., N. Koshikawa, H. Miyamori, M. Tanaka, T. Sasaki, Y. Okada, M. Seiki et H. Sato, 2003. "Cleavage of metastasis suppressor gene product KiSS-1 protein/metastin by matrix metalloproteinases." *Oncogene*, vol. 22, 30, p. 4617-26.
- Takino, T., H. Miyamori, N. Kawaguchi, T. Uekita, M. Seiki et H. Sato, 2003. "Tetraspanin CD63 promotes targeting and lysosomal proteolysis of membrane-type 1 matrix metalloproteinase." *Biochem Biophys Res Commun*, vol. 304, 1, p. 160-6.
- Tam, E. M., C. J. Morrison, Y. I. Wu, M. S. Stack et C. M. Overall, 2004. "Membrane protease proteomics: Isotope-coded affinity tag MS identification of undescribed MT1-matrix metalloproteinase substrates." *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 101, 18, p. 6917-22.
- Tang, C., B. T. Ang et S. Pervaiz, 2007. "Cancer stem cell: target for anti-cancer therapy." *Faseb J*, vol. 21, 14, p. 3777-85.
- Ueda, K., D. P. Clark, C. J. Chen, I. B. Roninson, M. M. Gottesman et I. Pastan, 1987. "The human multidrug resistance (mdr1) gene. cDNA cloning and transcription initiation." *J Biol Chem*, vol. 262, 2, p. 505-8.
- Uekita, T., Y. Itoh, I. Yana, H. Ohno et M. Seiki, 2001. "Cytoplasmic tail-dependent internalization of membrane-type 1 matrix metalloproteinase is important for its invasion-promoting activity." *J Cell Biol*, vol. 155, 7, p. 1345-56.
- Virchow, R., 1855. "Editorial." *Virchow Arch Pathol Anat Physiol Klin Med*, vol. 3, 23, p.
- Visse, R. et H. Nagase, 2003. "Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry." *Circ Res*, vol. 92, 8, p. 827-39.

Wang, X., D. Ma, J. Keski-Oja et D. Pei, 2004. "Co-recycling of MT1-MMP and MT3-MMP through the trans-Golgi network. Identification of DKV582 as a recycling signal." *J Biol Chem*, vol. 279, 10, p. 9331-6.

Weigmann, A., D. Corbeil, A. Hellwig et W. B. Huttner, 1997. "Prominin, a novel microvilli-specific polytopic membrane protein of the apical surface of epithelial cells, is targeted to plasmalemmal protrusions of non-epithelial cells." *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 94, 23, p. 12425-30.

Wicha, M. S., S. Liu et G. Dontu, 2006. "Cancer stem cells: an old idea--a paradigm shift." *Cancer Res*, vol. 66, 4, p. 1883-90; discussion 1895-6.

Will, H., S. J. Atkinson, G. S. Butler, B. Smith et G. Murphy, 1996. "The soluble catalytic domain of membrane type 1 matrix metalloproteinase cleaves the propeptide of progelatinase A and initiates autoproteolytic activation. Regulation by TIMP-2 and TIMP-3." *J Biol Chem*, vol. 271, 29, p. 17119-23.

Wu, Y. I., H. G. Munshi, R. Sen, S. J. Snipas, G. S. Salvesen, R. Fridman et M. S. Stack, 2004. "Glycosylation broadens the substrate profile of membrane type 1 matrix metalloproteinase." *J Biol Chem*, vol. 279, 9, p. 8278-89.

Yang, Z., Y. Chen, C. Lillo, J. Chien, Z. Yu, M. Michaelides, M. Klein, K. A. Howes, Y. Li, Y. Kaminoh, H. Chen, C. Zhao, Y. Chen, Y. T. Al-Sheikh, G. Karan, D. Corbeil, P. Escher, S. Kamaya, C. Li, S. Johnson, J. M. Frederick, Y. Zhao, C. Wang, D. J. Cameron, W. B. Huttner, D. F. Schorderet, F. L. Munier, A. T. Moore, D. G. Birch, W. Baehr, D. M. Hunt, D. S. Williams et K. Zhang, 2008. "Mutant prominin 1 found in patients with macular degeneration disrupts photoreceptor disk morphogenesis in mice." *J Clin Invest*, vol. 118, 8, p. 2908-16.

Yin, A. H., S. Miraglia, E. D. Zanjani, G. Almeida-Porada, M. Ogawa, A. G. Leary, J. Olweus, J. Kearney et D. W. Buck, 1997. "AC133, a novel marker for human hematopoietic stem and progenitor cells." *Blood*, vol. 90, 12, p. 5002-12.

Yin, S., J. Li, C. Hu, X. Chen, M. Yao, M. Yan, G. Jiang, C. Ge, H. Xie, D. Wan, S. Yang, S. Zheng et J. Gu, 2007. "CD133 positive hepatocellular carcinoma cells possess high capacity for tumorigenicity." *Int J Cancer*, vol. 120, 7, p. 1444-50.

Yu, Q. et I. Stamenkovic, 2000. "Cell surface-localized matrix metalloproteinase-9 proteolytically activates TGF-beta and promotes tumor invasion and angiogenesis." *Genes Dev*, vol. 14, 2, p. 163-76.

Yu, Y., A. Flint, E. L. Dvorin et J. Bischoff, 2002. "AC133-2, a novel isoform of human AC133 stem cell antigen." *J Biol Chem*, vol. 277, 23, p. 20711-6.

Zhai, Y., K. B. Hotary, B. Nan, F. X. Bosch, N. Munoz, S. J. Weiss et K. R. Cho, 2005. "Expression of membrane type 1 matrix metalloproteinase is associated with cervical carcinoma progression and invasion." *Cancer Res*, vol. 65, 15, p. 6543-50.

Zhao, T., H. Harada, Y. Teramura, S. Tanaka, S. Itasaka, A. Morinibu, K. Shinomiya, Y. Zhu, H. Hanaoka, H. Iwata, H. Saji et M. Hiraoka, 2010. "A novel strategy to tag matrix metalloproteinases-positive cells for in vivo imaging of invasive and metastatic activity of tumor cells." *J Control Release*, vol. 144, 1, p. 109-14.

Zhou, F., C. Cui, Y. Ge, H. Chen, Q. Li, Z. Yang, G. Wu, S. Sun, K. Chen, J. Gu, J. Jiang et Y. Wei, 2010. "{alpha}2,3-Sialylation Regulates the Stability of Stem Cell Marker CD133." *J Biochem*, p.

Zhou, Z., S. S. Apte, R. Soininen, R. Cao, G. Y. Baaklini, R. W. Rauser, J. Wang, Y. Cao et K. Tryggvason, 2000. "Impaired endochondral ossification and angiogenesis in mice deficient in membrane-type matrix metalloproteinase I." *Proc Natl Acad Sci USA*, vol. 97, 8, p. 4052-7.